

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta textilní

Bakalářská práce

Liberec 2014

Ondřej Javůrek

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta textilní

Studijní program: B3107 – Textil

Studijní obor: 3106R004/90 - 1 – Netkané textilie a nanomateriály

Výroba orientovaných nanovláknenných nosičů pro nervovou soustavu

Preparation of oriented nanofibrous scaffolds for nervous system

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.

Konzultant: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Autor: **Ondřej Javůrek**

Rozsah práce:

Počet stran: 52

Počet obrázků: 34

Počet grafů: 1

V Liberci dne 2. 1. 2014

(vložit originál zadání)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předložená *bakalářská* práce je původní a zpracoval jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem v práci neporušil autorská práva (ve smyslu zákona č. 121/2000 Sb. O právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

Souhlasím s umístěním *bakalářské* práce v Univerzitní knihovně TUL. Byl jsem seznámen s tím, že na mou *bakalářskou* práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 (školní dílo).

Beru na vědomí, že TUL má právo na uzavření licenční smlouvy o užití mé *bakalářské* práce a prohlašuji, že **souhlasím** s případným užitím mé *bakalářské* práce (prodej, zapůjčení apod.).

Jsem si vědom toho, že užít své *bakalářské* práce či poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem TUL, která má právo ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, vynaložených univerzitou na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).

V Liberci, dne: 20. 12. 2013

.....

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu této práce Ing. Jiřímu Chvojkovi, Ph.D. za odborné vedení, vynaložený čas a trpělivost. Dále mé poděkování patří Ing. Věře Jenčové, Ph.D. za časově náročné vedení a dohled na buněčné testování. V neposlední řadě bych poděkoval Ing. Denise Zálešákové za odborný dohled na práci v laboratořích.

Anotace

Elektrostatické zvlákňování je moderní technologie pro výrobu nanovláknenných textilií z polymerního roztoku. Při použití speciálních kolektorů je možné vyrábět textilie, které jsou složeny převážně z orientovaných vláken. Nanovláknenné struktury tohoto typu je možné využívat jako tkáňové nosiče, které určují nervovým buňkám směr jejich proliferace.

Cílem práce je navrhnout kolektor pro technologii elektrostatického zvlákňování (konkrétně technologii Nanospider), který na svém povrchu ukládá nanovláknenné vrstvy tvořené převážně orientovanými vlákny. Z vyrobených vláknenných vrstev následně sestavit tkáňové nosiče a ty otestovat na proliferaci buněčných kultur.

Klíčová slova

Elektrostatické zvlákňování

Tkáňový nosič

Orientovaná nanovláknna

Nervová soustava

Annotation

Electrospinning is a modern technology producing nanofibrous textiles from polymer solution. In case of using special types of collectors it is possible to produce textiles mainly composed of oriented fibers. These types of nanofibrous structures are possible to use as scaffold that leads direction of neural cells proliferation.

The goal is to design a collector for electrospinning technology (specifically Nanospider technology), which imposes on its surface nanofiber layer consisting mainly of oriented fibers. The produced fiber layers then assemble tissue scaffolds and test them for proliferation of cell cultures.

Key words

Electrospinning

Scaffolds

Oriented nanofibers

Nervous system

Seznam zkratek

PCL - polykaprolakton

PVA - polyvinylalkohol

PMMA - polymethylmethakrylát

PLA - kyselina polymléčná

PGA kyselina polyglykolová

PU - polyuretan

SI – soustava jednotek SI- zkratka z francouzského Le Système International d'Unités

cm – centimetr

mm - milimetr

nm - nanometr

μm – mikrometr

μl – mikrolitr

ml - mililitr

kV - kilovolt

Pa - pascal

s - sekunda

m - metr

kg – kilogram

hm % - hmotnostní koncentrace v procentech

CNS, PNS – centrální a periferní nervová soustava

FBS – fetal bovine serum – krevní sérum z kravského plodu

CO₂ – oxid uhličitý

OBSAH

1	Úvod	10
2	Elektrostatické zvlákňování (elektrospinning).....	11
2.1	Zvlákňování z Jehly	11
2.2	Zvlákňování z kovového hrotu	13
2.3	Technologie Nanospider	13
2.4	Parametry polymerního roztoku	14
2.4.1	Molekulová hmotnost polymeru	15
2.4.2	Koncentrace roztoku	15
2.4.3	Viskozita roztoku.....	16
2.5	Procesní parametry	16
2.5.1	Aplikované elektrické napětí	16
2.5.2	Rychlost dávkování polymeru.....	17
2.5.3	Typ kolektoru.....	18
2.5.4	Vzdálenost elektrod	19
2.6	Polymery pro elektrospinning.....	19
2.6.1	Polykaprolakton (PCL).....	20
2.6.2	Polyvinylalkohol (PVA)	20
3	Nervový systém člověka.....	21
3.1	Poškození míchy	22
4	Tkáňové inženýrství	23
4.1	Buněčné kultury	23
4.1.1	Kultivační podmínky.....	24
4.1.2	Kultivační média	25
4.1.3	Vybavení laboratoře buněčných kultur.....	26
4.1.4	Růst buněčné kultury	26
4.2	Tkáňové nosiče (Scaffoldy).....	27
4.2.1	Scaffoldy pro nervové systémy.....	29
5	Experimentální část	31

5.1	Zařízení pro tvorbu orientovaných nanovlákných vrstev	31
5.1.1	Návrh kolektoru	31
5.1.2	Sestavení zvlákňovacího zařízení	33
5.1.3	Návrh a realizace úprav zvlákňovací soustavy.....	36
5.1.4	Zvlákňování biodegradabilního polymeru.....	37
5.2	Analýza vyrobených nanovlákných vrstev	38
5.2.1	Průměry vláken.....	38
5.2.2	Orientace.....	39
5.3	Příprava finálních vzorků.....	40
5.4	Testování vzorků na prorůstání buněk	41
5.4.1	Buněčné testování finálních vzorků	42
5.4.2	Výsledky buněčného testování.....	44
6	Závěr.....	49
7	Literatura.....	51

1 ÚVOD

Elektrostatické zvlákňování je technologie pro výrobu nanovláken. Dříve se jednalo pouze o laboratorní technologii schopnou produkovat nanovláknenné vrstvy v jednotkách gramů za hodinu. Jako první na světě představila technologii pro průmyslovou výrobu nanovláknenných materiálů Technická univerzita v Liberci. Patent byl vyvinut na katedře netkaných textilií fakulty textilní kolektivem profesora Oldřicha Jirsáka RNDr. v roce 2004. Této technologii využívá i moderní medicína. Nanovláknena se využívají jako nosiče buněčných kultur pro obnovu tkání – tzv. scaffoldy (z angličtiny – lešení). Obor zabývající se touto tematikou se nazývá tkáňové inženýrství. Jde o technologii obnovy poškozených tkání, které se nejdříve pěstují tzv. *in vitro* – ve zkumavce a následně *in vivo* – v živém organismu. Do dnešních dob byly regenerovány hlavně tkáně pojivové (kosti, chrupavky, cévy) nebo tkáň nervová. Nanovláknenné tkáňové nosiče jsou velkou nadějí pro vědce v oboru tkáňového inženýrství, protože průměry vláken v nich zakomponovaných jsou velmi vhodné pro uchycení buňky, a zároveň velikost pórů v textilií je velmi příhodná pro růst pěstované buňky.

Cílem této práce je navrhnout a sestavit zařízení pro výrobu nanovláknenných scaffoldů, které se sestávají převážně z jednosměrně orientovaných vláken. Takto vyrobené tkáňové nosiče by měli sloužit jako mechanická opora pro růst buněčných kultur a zároveň napodobovat jejich přirozené mezibuněčné prostředí (tzv. extracelulární matrix). Důvodem snahy vyrobit orientovaná nanovláknena je hlavně kontrolovaná proliferace buněk (rychlé množení) právě ve směru orientace vláken. Dalším cílem práce bylo vyrobené vzorky otestovat na prorůstání buněk.

Teoretická část práce je zaměřená na řešení daného problému, použitelné technologie a materiály a možnosti ovlivňování parametrů procesu výroby nanovláken. Zároveň se teoretická část zabývá základními principy tkáňového inženýrství a obecně popisuje nervový systém člověka.

V experimentální části se práce zaměřuje hlavně na návrh a výrobu kolektoru (zařízení pro ukládání nanovláken při procesu elektrostatického zvlákňování). Dále na sestavení a úpravu celého zvlákňovacího zařízení, výrobu vrstev a následnou výrobu scaffoldů pro buněčné testování. Experiment je zakončen buněčným testováním a popisem práce v laboratoři buněčných kultur.

2 ELEKTROSTATICKE ZVLÁKNOVÁNÍ (ELEKTROSPINNING)

Elektrostatické zvláknování je technologie pro výrobu vláken z polymerního roztoku nebo polymerní taveniny. Pro výrobu vláken z polymerní taveniny byl zaveden pojem melt elektrospinning a proto je samotný pojem elektrospinning chápán jako zvláknování z polymerního roztoku. Touto technologií je možné tvořit velmi jemná vlákna. Typicky se jejich průměry pohybují v řádech od několika desítek nanometrů ($1 \text{ nm} = 1 \cdot 10^{-9} \text{ m}$) až po několik mikrometrů ($1 \text{ } \mu\text{m} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ m}$).

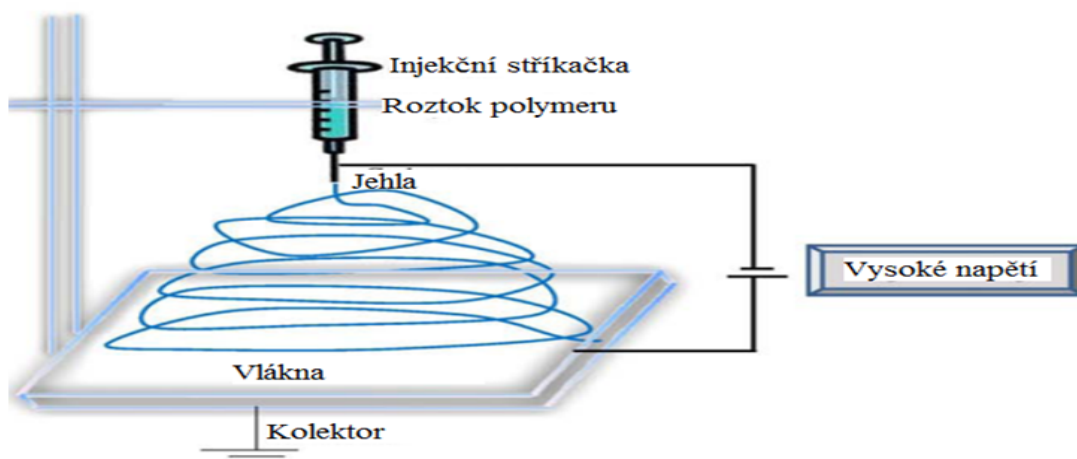
Technologie využívá dvou elektrod k tvorbě elektrického pole, jehož důsledkem se z polymerních roztoků tvoří nabitý proud, který jsou přitahovány od jedné elektrody ke druhé. V prostoru mezi elektrodami se začne kapka polymeru natahovat a formovat se do tvaru proudu. Následně se z polymerního roztoku odpaří rozpouštědlo a na druhé elektrodě, která se nazývá kolektor, se zachytávají samotná vlákna a tvoří se vlákenná vrstva. Tento proces byl patentován v roce 1934 německým vědcem Athonem Formhalsem, celým jménem Ing. Ludwig Rudolph Anton Formhals [20].

2.1 ZVLÁKNOVÁNÍ Z JEHLY

Nejjednodušším zařízením pro electrospinning je pipeta (nebo injekční stříkačka) s polymerním roztokem zakončená elektrodou (např. kovovou jehlou), která je nabíjena vysokým napětím o velikosti několika jednotek až desítek kilovoltů (kV). Pipeta bývá vybavena dávkovacím zařízením. Nejčastěji se k produkci vláken touto technologií využívá stejnosměrné napětí, ale je možné použít i napětí střídavé [13]. Vzhledem k relativně nízké produktivitě není toto zařízení vhodné pro průmyslovou výrobu nanovláken, jedná se tedy pouze laboratorní technologii.

V určité vzdálenosti od hrotu kovové jehly je umístěn kolektor (sběrná elektroda, např. z hliníku), který je uzemněn. V některých případech může být kolektor připojen ke zdroji napětí s opačnou polaritou. Mezi těmito dvěma elektrodami vzniká rozdíl potenciálů a tím pádem i elektrické pole. Polymerní roztok se nabíjí, na hladině roztoku dochází k nestabilitě a na povrchu polymerní kapky se tvoří tzv. Taylorův kužel. Kapka se vlivem elektrických přitažlivých sil formuje do polymerního proudu, který se po překonání sil povrchového napětí roztoku začne přitahovat směrem ke kolektoru [1]. Napětí, při němž se začnou tvořit vlákna, se nazývá kritické napětí. Tuto hodnotu je třeba překonat pro započetí procesu zvláknování.

Hodnota kritického napětí závisí na mnoha faktorech jako např. typ polymeru v roztoku, koncentrace roztoku nebo vzdálenost elektrod. Schéma jednoduchého laboratorního zařízení pro elektrostatické zvlákňování je zobrazeno na obrázku č. 1.

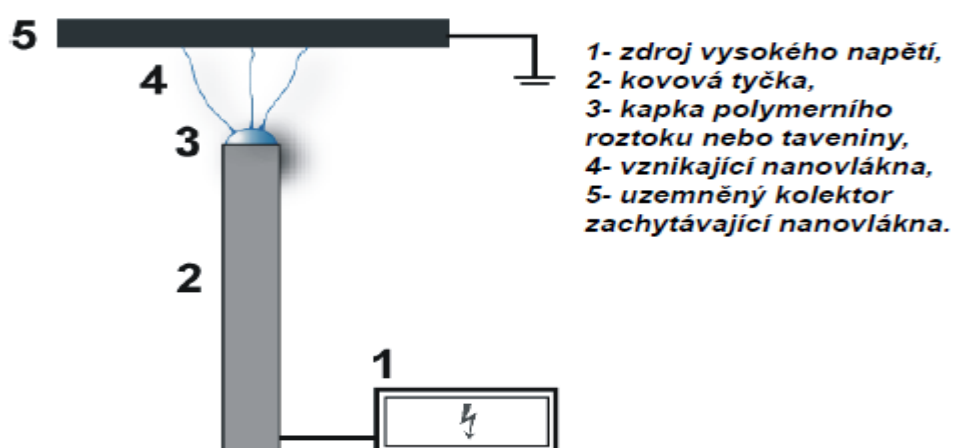


Obrázek 1 schéma elektrostatického zvlákňování „z jehly“ – převzato z [2]

Nejprve je proud stabilní a následně začne vykonávat tzv. bičovací pohyb, kdy se z polymerního roztoku začne vypařovat rozpouštědlo a na kolektor dopadají samostatná ultra jemná vlákna o průměru v řádech desítek nanometrů až několika mikrometrů. Tvoří se tak nanovláknenná vrstva [2]. Většinou je ke kolektoru připevněna ještě podkladová vrstva, na které se nanovláknna zachycují. Je totiž obtížné s vyrobenou vrstvou manipulovat kvůli jejím mechanickým vlastnostem. Pro představu se dá nanovláknenná vrstva přirovnat k velmi jemnému papírovému kapesníku nebo pavučině. Podkladová vrstva, např. tvrdší papír slouží jako mechanická opora vyrobené nanovláknenné vrstvy. Velmi malý průměr vláken s sebou přináší velký měrný povrch při velmi malé plošné hmotnosti textile. Tyto parametry jsou důležité při mnoha různých aplikacích nanovláknenných textile jako je např. filtrace kapalin, kryty ran (např. popálenin), textile pro řízené dodávání léčiv nebo pro tkáňové inženýrství, kde se využívají tzv. scaffoldy, které slouží jako mechanická opora pro růst buněk a tkání [1].

2.2 ZVLÁKŇOVÁNÍ Z KOVOVÉHO HROTU

Zvlákňování z tyčky (z kovového hrotu) je principiálně podobné jako zvlákňování z jehly, ale místo jehly používá jako první elektrodu kovovou tyčku, na kterou se nanáší kapka polymerního roztoku. Z polymerní kapky se může tvořit i několik Taylorových kuželů, na rozdíl od technologie zvlákňování z jehly, kdy se tvoří pouze jeden. Schéma zvlákňování z tyčky je zobrazeno na obrázku č. 2. Nanesená kapka je převedena pomocí elektrostatických přitažlivých sil na vlákna a vláknennou vrstvu během několika sekund. Poté je nutné nadávkovat další kapku polymerního roztoku. Proto zvlákňování z tyčky stejně jako zvlákňování z jehly patří mezi procesy laboratorní. Výrobnost těchto zařízení je velmi nízká (v jednotkách gramů za hodinu) a zařízení nejsou vhodná pro průmyslovou výrobu nanovláken.

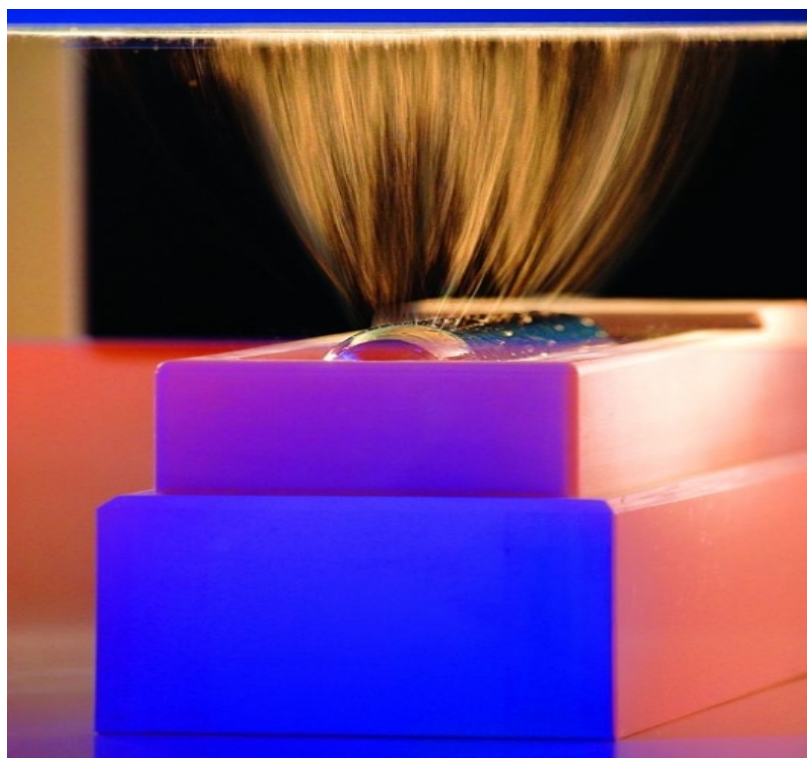


Obrázek 2 Schéma technologie zvlákňování z kovového hrotu [zdroj: přednáška TNA
<https://moodle.fp.tul.cz/nano/course/view.php?id=22>]

2.3 TECHNOLOGIE NANOSPIDER

Technologie Nanospider je patentem vyvinutým na Technické Univerzitě v Liberci v roce 2004. Je to první technologie na průmyslovou výrobu nanovláken. Jedná se o tzv. bezjehlové zvlákňování. Fyzikální princip technologie je prakticky stejný jako u zvlákňování „z jehly“ nebo „z hrotu“. Místo jehly nebo tyčky je u zařízení Nanospider použit váleček, který se otáčí a je částečně ponořen do polymerního roztoku. Na rozdíl od jehly, kde se tvoří pouze jeden Taylorův kužel, se při zvlákňování z válečku tvoří větší počet polymerních

proudů (viz. Obrázek č. 3). Počet Taylorových kuželů závisí na velikosti válečku a přivedeném napětí. Zařízení typu Nanospider disponuje mnohonásobně větší výrobností než všechny předchozí technologie na výrobu nanovláken. Společnost Elmarco, která vlastní licenci na výrobu strojů Nanospider uvádí maximální výrobnost 60 délkových metrů textilie za minutu [25].



Obrázek 3 váleček při zvlákňování technologií Nanospider [zdroj 25 - <http://www.elmarco.cz/technologie/technologie/>]

2.4 PARAMETRY POLYMERNÍHO ROZTOKU

Polymer pro elektrospinning musí být dodáván ve formě roztoku. Vlastnosti roztoku jako viskozita, koncentrace nebo povrchové napětí ovlivňují samotný proces zvlákňování a výslednou morfologii vytvořených vláken ve vlákenné vrstvě [13]. Kromě těchto veličin, proces ovlivňují i okolní parametry zahrnující vlhkost a teplotu okolního prostředí, které také hrají významnou roli ve formování vláken [2]. Následující podkapitoly pojednávají o konkrétních parametrech a jejich vlivu na zvlákňování.

2.4.1 MOLEKULOVÁ HMOTNOST POLYMERU

Polymery jsou tvořeny opakujícími se jednotkami (monomery) spojenými chemickými vazbami v polymerní řetězce. Molekulová hmotnost polymeru je součtem molekulových hmotností všech monomerů [13]. Molekulová hmotnost roztoku má vliv na reologické a elektrické parametry roztoku jako je viskozita, povrchové napětí nebo vodivost. Je dalším důležitým parametrem, který ovlivňuje morfologii vláken. Obecně se pro electrospinning používají roztoky s vyšší molekulovou hmotností, protože poskytují požadovanou viskozitu pro formaci vláken. Bylo zjištěno, že příliš nízká molekulová hmotnost má za následek tvorbu perličkového efektu a naopak příliš vysoká molekulová hmotnost roztoku, znamená vyšší viskozitu a tudíž i větší průměr vláken [3]. Molekulová hmotnost reflektuje počet zapletení polymerních řetězců, tedy viskozity roztoku. Pokud je přítomno hodně těchto řetězců, je tedy vysoká viskozita a polymerní roztok tak může být elektrostaticky zvlákňován i při nízké koncentraci, aniž by vznikl tzv. perličkový efekt na nanovláknenné vrstvě. Např. zvlákňování vysokomolekulární kyseliny polymléčné – (HM-PLLA) [2]. Pokud bychom rozpustili v rozpouštědle monomerní látku, která má v porovnání s polymerem řádově nižší molekulovou hmotnost, měl by roztok tak nízkou viskozitu, že by nešel zvlákňovat. Při takto nízké viskozitě roztoku by mohlo docházet k elektrostatickému rozprašování [14].

2.4.2 KONCENTRACE ROZTOKU

Koncentrace polymeru ovlivňuje dva další velmi důležité parametry, viskozitu a povrchové napětí. Bylo zjištěno, že při nízké koncentraci se spolu s vlákny tvoří tzv. perličky, které jsou důsledkem velkého povrchového napětí polymerního roztoku. Vlákno se rozpadá na kapičky, které ulpívají na kolektoru spolu s vlákny [3]. Se zvyšující se koncentrací se sférický tvar perliček na vláknech mění na větvenovitý tvar a při určité koncentraci vznikají už jen samotná vlákna. S rostoucí koncentrací roste také průměr formovaných vláken. Proto by měla být zjištěna ideální koncentrace polymerního roztoku pro zvlákňování. Koncentrovanější roztoky se nedají zvlákňovat kvůli jejich vysoké viskozitě [2].

2.4.3 VSKOZITA ROZTOKU

Viskozita polymerního roztoku je také parametrem, který ovlivňuje proces elektrospinningu i charakteristiku tvořených vláken. Bylo zjištěno, že při nízké viskozitě není tvorba vláken kontinuální, ale přerušovaná [1]. Pokud je viskozita roztoku příliš nízká, nedochází k elektrospinningu, ale pouze k tzv. elektrosprayingu, na kolektoru se neformují vlákna, ale pouze kapičky polymerního roztoku. Zvyšování viskozity roztoku úzce souvisí s jeho koncentrací, a proto s rostoucí viskozitou elektrospraying přechází na elektrospinning, ale na vláknech se tvoří perličkový efekt. S dalším růstem viskozity se perličky postupně vytrátí [13]. Při příliš vysoké viskozitě roztoku není elektrické pole schopno vytvořit proud, ze kterého by se vytvořila vlákna. Viskózní polymerní roztok obsahuje malé množství rozpouštědla, a tak roztok vůbec neprojde úzkou jehlou nebo je tak viskózní, že než se stačí vytvořit vlákna, vypaří se rozpouštědlo a polymer zasychá rovnou na hrotu jehly [15]. Proto je kladen důraz na zajištění ideální viskozity pro tvorbu vláken. Tato hodnota se u různých polymerů může výrazně lišit. Obecně byl maximální rozsah viskozit (dynamických) pro elektrospinning stanoven na $0,1 - 21,5 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ (v jednotkách SI $\text{m}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$) [2].

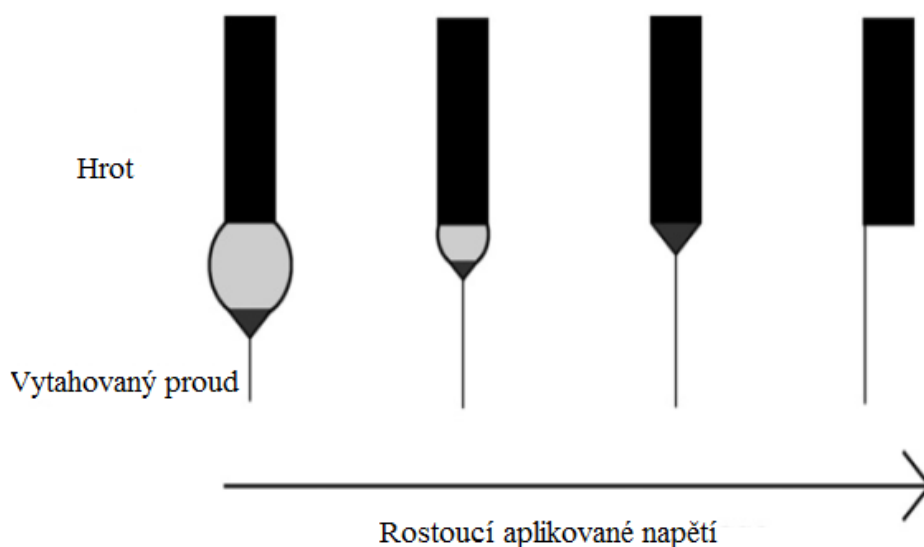
2.5 PROCESNÍ PARAMETRY

Mezi parametry procesu patří elektrické pole, vzdálenost jehly a kolektoru nebo rychlost dávkování polymeru. Tyto vlastnosti mají vliv na morfologii vlákna, ale ne tak významný jako parametry roztoku [13].

2.5.1 APLIKOVANÉ ELEKTRICKÉ NAPĚTÍ

Elektrické napětí tvoří elektrické pole a proto je důležitým procesním parametrem elektrospinningu. Při nízkém napětí se vlákna netvoří, protože elektrické síly jsou příliš malé na překonání povrchového napětí roztoku a vytvoření polymerního proudu. Taylorův kužel a samotná vlákna se začínají formovat až při dosažení tzv. kritického napětí (obecně v řádech jednotek až desítek kV) [3]. S větším napětím průměr vlákna klesá z důvodu větších

Coulombových sil a elektrického pole [13]. Větší hodnota napětí má za následek i rychlejší evaporaci rozpouštědla [2]. Velikost napětí tedy ovlivňuje průměr tvořených vláken, avšak hodnoty se liší jak u různých polymerů, tak i v závislosti na koncentraci roztoku a vzdálenosti hrotu jehly od kolektoru. Při příliš velkém vstupním napětí může docházet k nestabilitě Taylorova kužele a k tvorbě nežádoucího perličkového efektu na vláknech [16]. Bylo také zjištěno, že při vyšším aplikovaném napětí roste podíl krystalické fáze polymerních vláken na kolektoru [15]. Vytahování polymerního proudu z roztoku je zobrazeno na obrázku č. 4.



Obrázek 4 vytahování polymerního proudu z roztoku při rostoucím napětí, převzato z [3]

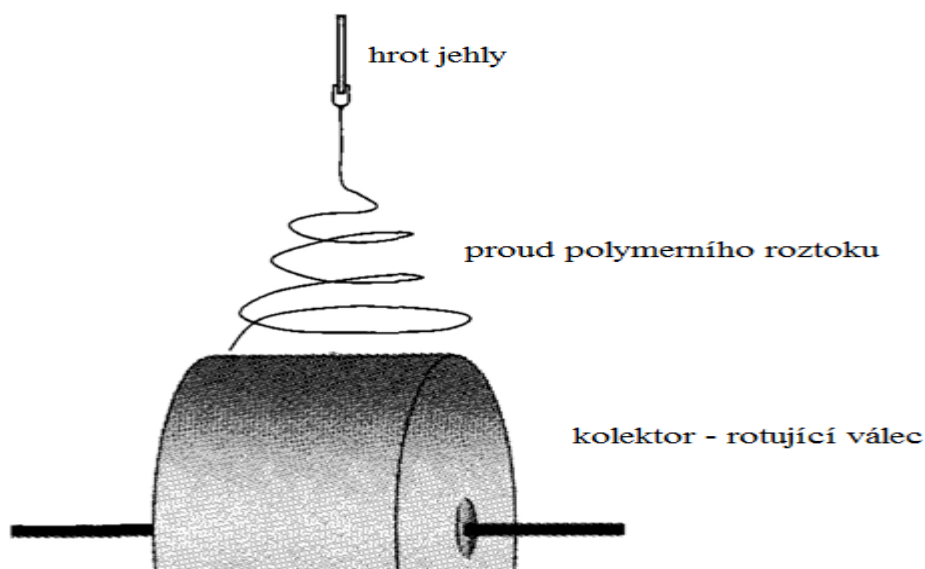
2.5.2 RYCHLOST DÁVKOVÁNÍ POLYMERU

Dávkování udává množství polymerního roztoku, který je k dispozici pro elektrosinning, za jednotku času. Pro každou hodnotu dávkování existuje odpovídající vstupní napětí nutné k udržení stabilního Taylorova kužele [2]. Obecně je vyžadována nižší hodnota dávkování, protože zajistí rozpouštědлу dostatek čas na vypaření. Bylo zjištěno, že při zvýšení dávkování při zvláknování polystyrenu se zvyšuje i průměr vláken a mezivlákněných pórů. Při vysoké hodnotě dávkování polymeru je častější výskyt perličkového efektu na vlákně vrstvě nebo shlukování vláken, protože rozpouštědlo se nestihne úplně vypařit. [15]

2.5.3 TYP KOLEKTORU

Důležitým aspektem pro vzhled a strukturu vlákenné vrstvy je typ použitého kolektoru. Obecně se používá deska nebo fólie z vodivého materiálu, ale s potřebou výroby orientovaných vrstev se začaly používat i jiné typy kolektorů. Pro tvorbu orientovaných vláken je možné použít např. dělené elektrody, které jsou v určité vzdálenosti od sebe, vlákna se pak formují ve směru od jedné k druhé elektrodě [2].

Další možností pro tvorbu vrstev z orientovaných vláken je použití rotačních kolektorů (viz. Obrázek č. 5), které také zajistí orientaci vláken ve vrstvě. Používají se válce nebo strunové kolektory, které rotují rychlostí alespoň 500 otáček za minutu. Na nich se vlákna orientují ve směru otáčení kolektoru [13].



Obrázek 5 Schéma elektrospinningu s rotujícím kolektorem, převzato z [13]

2.5.4 VZDÁLENOST ELEKTROD

Polymerní proud vystupující z Taylorova kuželu potřebuje určitý čas na vypaření rozpouštědla. Pokud by vzdálenost kolektoru od hrotu byla malá, rozpouštědlo by se vypařilo pouze částečně a na vláknech by se tvořily perličky nebo by se vlákna spojovala do shluků [14]. Pokud by byla vzdálenost naopak příliš velká, mohlo by docházet k tzv. elektrosprayingu. Proto je potřeba najít ideální vzdálenost pro zvlákňování. Ta se pohybuje v rozmezí cca 5 – 20 cm [2]. Bylo zjištěno, že při zvětšování vzdálenosti elektrod se zmenšuje průměr vytvořených vláken [3].

2.6 POLYMERY PRO ELEKTROSPINNING

Existuje velmi široké spektrum polymerů, které můžeme pro tento postup výroby nanovlákných vrstev použít. Používají se polymery přírodní, syntetické i jejich směsi. Dále také některé druhy proteinů (kolagen, želatina) nebo polysacharidů (škrob, celulóza, chitosan) [13].

Nanovlákněné vrstvy vyrobené z celé řady polymerů jsou velmi často využívány v biomedicině. Přírodní polymery obecně v porovnání se syntetickými vykazují lepší biokompatibilitu (tělo je schopné je přijmout) a nižší imunogenecitu (vyvolávání imunitních reakcí). Typickými přírodními polymery jsou např. kolagen, chitosan, želatina, kasein, celulóza, chitin, fibrin nebo přírodní hedvábí. Nevýhodou přírodních polymerů je jejich denaturace (rozpad struktury) nebo také to, že se velmi často výrobky liší na šarži polymeru. Proto se stále častěji upřednostňují polymery syntetické. Typickými příklady syntetických polymerů pro elektrospinning jsou např. kyselina polyléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), poly-ε-kaprolakton (PCL), polyuretan (PU) nebo některé jejich kopolymery. Tyto polymery jsou biodegradabilní (v těle se rozloží a vyloučí) a jsou tedy vhodné např. pro využití v tvorbě biologických náhrad (kostí, chrupavek, cév a nervů) nebo jako kryty ran s řízeným dodáváním léčiv (např. pro léčbu popálenin) [2].

2.6.1 POLYKAPROLAKTON (PCL)

Poly (ϵ -kaprolakton) je alifatický polyester s teplotou tání okolo 60 °C a teplotou skelného přechodu kolem -60°C. Vzniká polymerací ϵ -kaprolaktonu a je to biologicky odbouratelný a biologicky kompatibilní polymer [9]. V těle se rozkládá hydrolýzou esterových vazeb, a proto se řadí mezi nejčastěji používané materiály pro výrobu zdravotních implantátů. Doba rozkladu je o něco delší než u používanější kyseliny polymléčné [10]. Poly (ϵ -kaprolakton) je rozpustný např. v dichlormethanu, dimethylformamidu, metanolu nebo chloroformu. Chloroform je často používaným rozpouštědlem PCL, ale při elektrospinningu takto připraveného roztoku vznikají vlákna větších rozměrů (3-4 μm), proto se používá chloroform ve směsi např. s etanolem [17].

2.6.2 POLYVINYLALKOHOL (PVA)

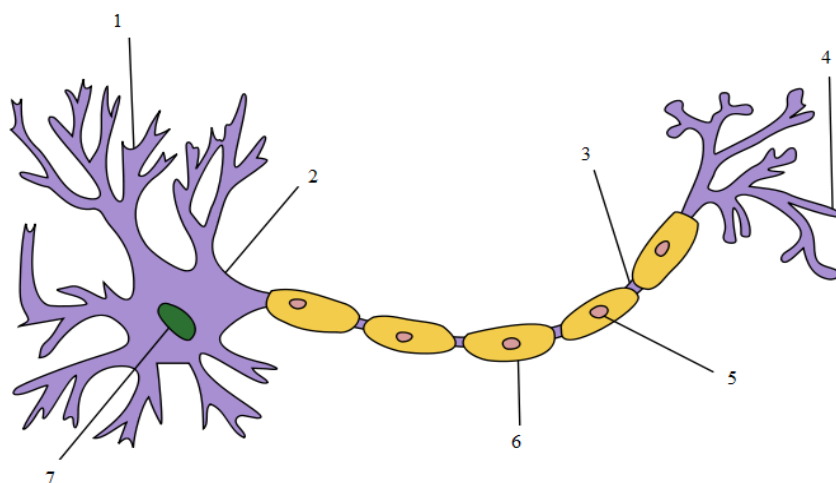
Polyvinylalkohol je syntetický polymer s relativně jednoduchou chemickou strukturou. Vyrábí se hydrolýzou polyvinylacetátu jeho např. v metanolu. Hydrolýza polyvinylacetátu (PVAc) nebývá úplná, a tak se PVA v podstatě vždy vyskytuje jako kopolymer PVA a PVAc. Komerčně je PVA většinou k dostání s vysokým stupněm hydrolýzy (98,5 %). Stupeň hydrolýzy ovlivňuje rozpustnost polymeru ve vodě, ta klesá s rostoucím stupněm hydrolýzy [18]. I přes to je PVA polymer rozpustný ve vodě a plně degradabilní. Taje při 230 °C a Je odolný vůči olejům a některým rozpouštědlům. Využívá se např. jako přídavek do papíru, kde zajišťuje jeho větší odolnost vůči olejům [18].

3 NERVOVÝ SYSTÉM ČLOVĚKA

Všechny mnohobuněčné organismy jsou tvořeny buňkami. Většina těchto buněk je zorganizována do vzájemně spolupracujících skupin zvaných tkáně. U obratlovců se rozeznáváme tkáň epitelovou, svalovou, pojivovou a nervovou. Tkáně nejsou tvořeny pouze buňkami, ale také tzv. extracelulární matrix (mezibuněčný prostor), kterou kolem sebe vylučují, a která tkáním dodává pevnost a soudržnost. Buňky v tkáních mají určitou životnost a tak některé umírají a jiné je nahradí. Problémem dnešní medicíny jsou právě poruchy regenerace tkání. Buňky musí být na správném místě nahrazeny ve správném počtu. Pokud je již buněk dostatek, dochází k tzv. kontaktní inhibici – zastavení tvorby nových buněk v důsledku kontaktu s dalšími buňkami. Pokud k této inhibici nedojde, jedná se o tzv. nádorové bujení.

Nervové buňky (viz. Obrázek č. 6) mají za úkol přenášet elektrické impulzy v rámci nervové soustavy od nervových zakončení k mozku nebo naopak. Nervová síť pokrývá celé lidské tělo a informace získané v nervových zakončeních posílá do mozku. Ten informace vyhodnocuje a přenáší různé povely do různých částí těla. Nervovou soustavu lidského těla můžeme rozdělit na dva nervové systémy, centrální (CNS) a periferní (PNS). Centrální nervový systém se skládá z mozku a míchy. Periferním nervovým systémem je síť nervů, která vychází z míchy a je rozvětvena po celém lidském těle. Součástí PNS je také autonomní nervový systém, který neovládáme vlastní vůlí. Tento systém se stará o funkci orgánů. Buňky, které tvoří nervovou soustavu, nazýváme neurony. Jednotlivé nervové buňky mezi sebou komunikují pomocí slabých elektrických signálů neboli impulsů. Rychlost impulsu dosahuje až $400 \text{ km} \cdot \text{h}^{-1}$. Délka neuronů je různá, od spodního okraje páteře vede nerv sahající až na špičku palce u nohy, který u dospělého člověka dosahuje délky přibližně jeden metr. Oproti tomu jsou některé neurony dlouhé jen zlomky milimetru. Neuron tvoří klubko dendritů (nervových zakončení) a dlouhý přenašeč impulsů zvaný axon. V řetězci nervových buněk jsou dendrity jedné buňky v těsném kontaktu s axonem té následující. Mezi nimi je nepatrná štěrbina zvaná Synapse, do které axony produkují přenašeče impulsů nazývané neurotransmitery. V okamžiku, kdy se elektrický impuls ocitne na konci axonu, začne vylučování neurotransmiterů. Ty překlenou synapsi a podráždí dendrity následujícího neuronu a vytvoří v něm stejný elektrický impuls, který předávala předchozí buňka. Tento proces se řetězově opakuje na dalších neuronech a s každou synapsí elektrický signál lehce zeslabuje. Tento proces je však vždy jednosměrný, např. při chůzi se přenášejí signály z mozku přes

míchu k nervům. Na druhou stranu putují impulsy např. při bolesti. Každý směr má svou sadu nervových buněk [18].



Obrázek 6 1 - dendrit, 2- tělo neuronu, 3- Ranvierův zářez, 4- axonální zakončení, 5- Schwannova buňka, 6- axon, 7 - jádro, zdroj: <http://en.wikipedia.org/wiki/Neuron>

3.1 POŠKOZENÍ MÍCHY

Nervové tkáňové inženýrství se zaměřuje hlavně na léčbu poškození míchy, která je součástí centrálního nervového systému (CNS). Počáteční neurologické poškození vyvolává série buněčných a biochemických reakcí, které vedou k sekundárnímu poškození míchy. Sekundární poškození pak brání nervovým buňkám v regeneraci a způsobuje další odumírání nervových buněk. Počáteční buněčná smrt tvoří dutiny (léze) v místě poranění a tzv. gliové jizvy v okolí lézí. Terapeutickou strategií pro opravu míchy je obnovení poškozených axonů, podpora axonálního růstu skrze lézi a usměrňování jejich růstu. S tím souvisí i tzv. reinervace – obnova poškozených nervových synapsí [7].

4 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Pozn. kapitola č. 4 byla sepsána podle informací ze zdrojů č. [26] a [27]

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor zabývající se vývojem buněčných implantátů, které slouží k náhradě, obnově nebo zlepšení funkcí lidských tkání. Díky velkému pokroku tohoto vědeckého oboru v posledních letech se uměle vypěstované tkáně začaly implantovat do lidského těla. Nejběžnější tkáňovou náhradou jsou implantáty kolenní chrupavky vypěstované *in vitro* (z latin. ve skle) na tzv. scaffoldu (z angličtiny - lešení) z přírodního nebo syntetického biodegradabilního polymeru [19].

4.1 BUNĚČNÉ KULTURY

Buněčné kultury slouží jako model pro experimenty s růstem buněk *in vitro*. Výhodou testování *in vitro* je použití homogenních buněčných kultur, které nejsou ovlivňovány dalšími typy buněk a tkání. Nedochází tak k interakcím různých buněčných populací jako při testování na laboratorních zvířatech neboli *in vivo* (z latiny – v živém organismu). Další výhodou je etický aspekt experimentu s buněčnou kulturou. Poškození experimentálního modelu při testování na zvířatech může mít za následek smrt nebo nenávratné poškození jedince, což je z hlediska etiky velký problém. Poškození buněk nebo orgánů u lidského dobrovolníka je z tohoto hlediska zcela nemožné.

Na druhou stranu je potřeba zmínit to, že podmínky, za kterých jsou buněčné kultury pěstovány, nejsou zcela shodné s přirozeným fyziologickým prostředím. Buňky jsou kultivovány v umělém kultivačním médiu, které nenapodobuje přirozené prostředí organismu úplně přesně. Tak jako je homogenost buněčných kultur výhodou, je zároveň jejich nevýhodou. Buňky postrádají přítomnost jiných typů tkání, se kterými by v přirozeném prostředí komunikovaly. „*Stručně shrnuto: při experimentech s kultivovanými buňkami musíme mít na paměti, že pracujeme s modelem in vitro, který může a nemusí dobře odrážet poměry za podmínek in vivo. Práce s kultivovanými buňkami je pro výzkum velmi přínosná a rozšiřuje možnosti, které nám poskytují jiné pokusné modely, nemůže však nahradit pokusy prováděné na tkáních, orgánech a laboratorních zvířatech nebo lidských dobrovolnících.*“ [M. Vejražka – zdroj č. 26]

Manipulace s buněčnými kulturami je velmi nákladnou záležitostí. Laboratoře musí disponovat nákladným technickým vybavením a používat speciální sterilní jednorázové materiály, které se svou cenou markantně liší od obvyčejné laboratorní výbavy. Další velmi nákladnou záležitostí takovéto práce je proškolení pracovníků laboratoří na znalost veškerých požadavků na sterilitu a přesnost práce s buněčným materiálem. Práce s buněčnými kulturami bývá často také velmi zdlouhavá a náročná na soustředění a pozornost.

Zdrojem pro založení buněčné kultury je laboratorní zvíře nebo člověk. První kulturu izolovaných buněk nazýváme primokulturou. Následně se buňky množí, ředí a přenášejí do nových kultivačních nádob, tím vzniká sekundární kultura neboli subkultura. Tento postup nazýváme pasážování. Buňky subkultury pěstujeme do doby, než získáme dostatečné množství materiálu pro experiment.

4.1.1 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

Pro kultivaci buněčných kultur a proliferaci buněk je nutné zajistit vhodné podmínky. Jednou z nejdůležitějších podmínek je přílnavý povrch kultivační nádoby, na kterém se mohou buňky „udržet“ a proliferovat. Nejčastěji se kultivační nádoby vyrábějí z polystyrenu s hydrofilní povrchovou úpravou. Buňky se zpravidla kultivují při teplotě 37 °C, která je blízká jejich přirozenému prostředí. V inkubátoru je také zvýšená koncentrace CO₂, obvykle 5%, což pomáhá udržovat stálou hodnotu pH v použitých médiích. Médium rozumíme kapalinu obsahující živiny a další látky důležité k růstu buněčných kultur. Pro zabránění odpařování vody se v inkubátorech udržuje relativní vlhkost kolem 90%. Inkubátory tedy musí zajišťovat regulaci teploty, relativní vlhkosti a koncentrace CO₂, a zároveň musí umožňovat snadné čištění, desinfekci, popřípadě i sterilizaci vnitřních povrchů pro zabránění kontaminace buněčných kultur bakteriemi a plísněmi.

4.1.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA

Buněčné kultury rostou v médiu, které simuluje mezibuněčné prostředí (extracelulární matrix). Médium obsahuje živiny nezbytné pro život buněk a zároveň buňkám umožňuje dostatečně rychlou difúzi kyslíku a CO₂. Médium se mění z pravidla dvakrát až třikrát za týden, protože buňky za pár dní vyčerpají zásoby živin v médiu. "Kultivační médium musí mít vhodné fyzikálně chemické vlastnosti a musí obsahovat ve vhodné koncentraci látky, které buňky potřebují pro život a proliferaci. Jde o vodné roztoky obsahující mnoho, někdy i několik desítek složek. Mezi nejvýznamnější látky obsažené v kultivačních médiích patří anorganické soli (uhličitan, fosfáty, pufrý (hodnota pH pufrů je velmi blízká fyziologickému pH 7,4), glukosa a případně i jiné zdroje energie, vitamíny, bílkoviny, růstové faktory, některé peptidy, mastné kyseliny a lipidy a stopové prvky. " obvykle se do médií přidává fenolová červen, která při pH 7,4 má jasně červenou barvu a v kyselém prostředí žloutne. Buňky při růstu do média vylučují kyselé látky, zežloutnutí je tedy indikátorem nutnosti výměny média. V neposlední řadě jsou média obohacena o antibiotika, která zabraňují kontaminaci buněk bakteriemi. Volba konkrétního média vychází ze zkušeností a doporučení, neexistují obecně platná pravidla. Některé vyjmenované látky jsou obsaženy v krevních sérech, které se do médií někdy přidávají. Podle toho dělíme média na bezsérová (0% séra), se sérem (10%) nebo média s nízkým obsahem séra (2%). Přídavkem séra bývají média obohacena o velké množství důležitých látek, jako jsou růstové faktory nebo bílkoviny, které pomáhají buňkám odolávat mechanickým poškozením. Nejčastěji se používá tzv. bovinní sérum, které je obvykle získáváno z telecích fétů (fetus - plod). Média je třeba skladovat při 4 °C a ve tmě. V takových podmínkách je médium použitelné až měsíc. Obvykle se médium včetně přísad připravuje do zásoby maximálně na 2 týdny, protože některé složky (například růstové faktory) postupně ztrácejí účinnost.

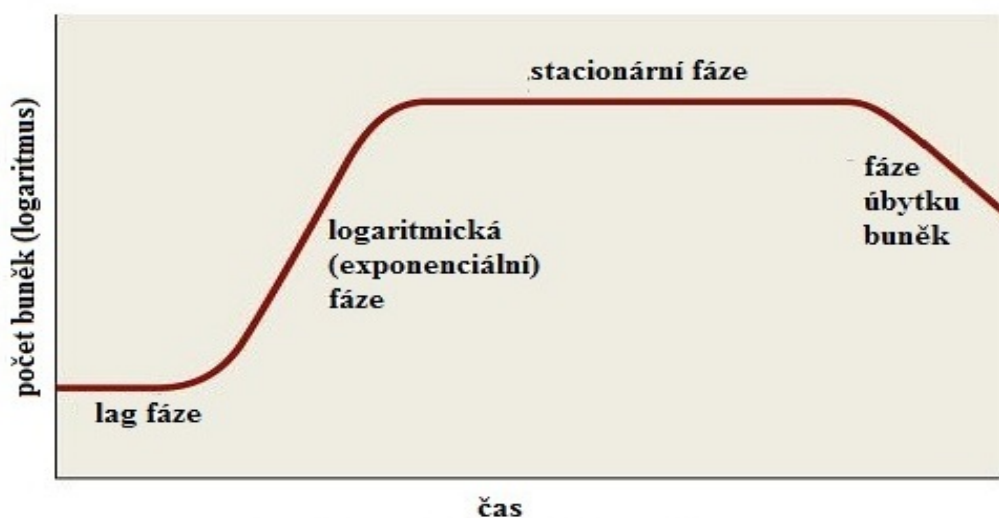
4.1.3 VYBAVENÍ LABORATOŘE BUNĚČNÝCH KULTUR

Kvůli zabránění kontaminace buněčných kultur je potřeba dodržet sterilní pracovní postupy. Je tedy nutné zajistit co největší čistotu laboratoře včetně všech povrchů a co nejmenší koncentraci kontaminujících částic ve vzduchu. Nepostradatelným prvkem laboratoře je laminární box, který umožňuje sterilní práci v prostředí s filtrovaným vzduchem. Boxy obvykle chrání materiál uvnitř a zároveň prostředí laboratoře před kontaminací. K dalším nezbytným zařízením patří inkubátor, mikroskop, vodní lázeň, chladnička, mraznička a hlubokomrazicí box. Laboratorní pomůcky a materiály musí být desinfikované nebo sterilní. Sterilní materiály jsou zcela zbaveny všech mikroorganismů, desinfekce pouze snižuje riziko kontaminace, protože se při ní ničí větší část mikroorganismů, ne však všechny. Mezistupněm mezi desinfekcí a sterilizací je tzv. rozšířená desinfekce, která spolehlivě likviduje všechny běžné mikroorganismy, ale nelikviduje cysty (přečkávací stádium bakterie). K rozšířené desinfekci se používá roztok kyseliny peroxyoctové (Persteril). Ke sterilizaci materiálů se používá autokláv (nasycená vodní pára při teplotě kolem 121 °C a zvýšeném tlaku). Někdy se používá horko vzdušná sterilizace (například 180°C / 60 minut) - například sklo. Průmyslová sterilizace se provádí gama zářením.

4.1.4 RŮST BUNĚČNÉ KULTURY

První fázi růstu buněčné kultury nazýváme lag fáze. Počet buněk je velmi malý a jejich množení je pomalé. V další fázi růstu buněčné kultury se buňky množí prakticky exponenciálně. Tato fáze se nazývá logaritmická. Poté nastává tzv. stacionární fáze (plató), kdy se počet buněk ustálí v důsledku tzv. kontaktní inhibice, buňky utvoří souvislou vrstvu a další množení se zastaví. Následně již buňky umírají v důsledku tzv. apoptózy (programovaná buněčná smrt). Buňky nádorového typu se množí stále a kontaktní inhibice se u nich neobjevuje. Tvoří se shluky buněk, a pokud se buňky nezředí včas, začnou buňky ze středu shluku odumírat, protože nemají k dispozici dostatek živin. Závislost logaritmické hodnoty počtu buněk v kultuře na čase je naznačena na obrázku č. 7. V laboratořích je cílem pěstovat buňky právě v logaritmické fázi. Před koncem této fáze se buňky pasážují. Oddělí se od povrchu kultivační nádoby, naředí se médiem a nasadí do nových nádob v takové koncentraci, aby znovu rostly v exponenciální fázi. Počet pasáží jedné primární kultury, které je možné

provést je omezený. Při dosažení určitého počtu pasáží dochází ke stárnutí kultury. Buňky se přestanou dělit. Životnost kultury závisí na jejím typu a také původu. Buňky získané z embryí lze kultivovat delší dobu než buňky z dospělých jedinců. Stárnutí buněk se neprojevuje u kontinuálních nebo nádorových kultur nebo u kultur, u kterých byla provedena tzv. immortalizace, při které jsou buňky chemicky nebo virově transformovány.



Obrázek 7 fáze buněčného růstu zdroj: http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/4_growth/

4.2 TKÁŇOVÉ NOSIČE (SCAFFOLDY)

Tkáňové nosiče jsou polymerní biomateriály, které slouží jako mechanická podpora růstu tkání. Nasazené buňky se přichytí a rostou na nosiči ponořeném v kultivačním médiu. Scaffoldy s buňkami mohou být následně implantovány do lidského těla za účelem regenerace poškozené tkáně. V historii tkáňového inženýrství bylo vyvinuto mnoho textilních scaffoldů o vláknenných průměrech v řádu mikrometrů. Bylo však zjištěno, že lidské tkáně mají vláknitou strukturu. To zájem vědců přesunulo k nanovláknenným polymerním scaffoldům z nichž se tvoří náhrady cév, chrupavek, kostí, nervových tkání nebo kůže [13].

Z různých polymerů se vytváří již zmíněné nanovláknenné scaffoldy, které slouží jako matrice pro buněčný růst, proliferaci (četné množení buněk) a formaci nové tkáně ve třech směrech. Zájem o elektrostaticky zvlákněné scaffoldy lze přičíst zejména tomu, že tato technologie dokáže relativně snadno vyrobit vrstvy s vlákny o průměrech v řádech desítek až stovek nanometrů. Tkáňové inženýrství je obor, který se zabývá vývojem biologických náhrad nebo také obnovou, údržbou a zlepšováním funkce tkání. Pro tvorbu nebo regeneraci živých tkání jsou textilní scaffoldy velmi důležité. Poskytují buňkám tkáně dočasnou šablonu pro

nasazení, invazi, proliferaci a diferenciaci buněk. Elektrostaticky zvlákněné scaffoldy napodobují přirozené mezibuněčné prostředí (extracelulární matrix – ECM) [5], např. elektrostaticky zvlákněná vrstva kopolymeru kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA) je považována za velmi vhodnou pro tkáňové inženýrství. Hlavním důležitým parametrem jsou vlákna o průměru v řádu nanometrů, která mají podobnou velikost jako fibrily v ECM. Díky těmto velmi malým rozměrům vláken se buňka dokáže snadno na scaffoldu uchytit. Dalším parametrem, který pozitivně ovlivňuje proces tvorby nové tkáně je vysoká pórovitost, která se u elektrostaticky zvlákněného PLGA pohybuje nad hranicí 90% [2].

Pro správný růst buněk a tkání na scaffoldu jsou důležité následující parametry. Prvním parametrem je velikost pórů, pokud jsou póry příliš malé, buňky nemohou textilií prostupovat. Pokud jsou naopak příliš velké, buňky se v nich nedokážou udržet. Průměr buňky tedy určuje požadovaný průměr póru. Dále je to vysoký měrný povrch, který ovlivňuje adhezi, růst, migraci a diferenciaci buněk. Důležitá je také biodegradabilita a biokompatibilita vláknenné vrstvy. Scaffold musí zároveň mít dobré mechanické vlastnosti, aby byl schopen novou tkáň udržet pohromadě [4]. Materiál pro tento medicínský obor musí splňovat řadu požadavků. Tím nejdůležitějším je biokompatibilita, to znamená, že v organismu nevyvolává žádné nežádoucí reakce. Měla by tudíž být minimalizována toxicita, stejně jako zánětlivé a imunologické reakce. Takové materiály, které nevyvolávají žádnou, nebo pouze velmi malou, reakci v kontaktu s tkání nebo extracelulární tekutinou, nazýváme bioinertní. Počáteční výzkum v tkáňovém inženýrství spočíval na použití bioinertních materiálů. Naopak dnešní výzkum v této oblasti používá materiály bioaktivní, které záměrně vyvolávají interakci v buněčném prostředí. Jako bioaktivní materiály je možné použít širokou škálu polymerů. Patří mezi ně jednak přírodní polymery, ale i polymery syntetické a jejich hybridy. Syntetické materiály je možno dále dělit na biologicky odbouratelné (biodegradabilní) a neodbouratelné. Velkou výhodou biodegradabilních polymerů je jejich schopnost se v buněčném prostředí rozložit, odpadá tak nutnost další operace kvůli vyndávání scaffoldu z těla. Důležité je, aby látky, na které se biodegradabilní polymer rozloží, nebyly pro organismus toxické [2]. Doba biologického rozkladu může být správným poměrem krystalické a amorfni fáze polymeru prodloužena tak, že téměř odpovídá době růstu nové tkáně. To znamená, že zároveň s růstem nové tkáně se scaffold rozloží. Krystalická fáze polymeru má delší dobu rozkladu [5].

Nejčastěji používanými biodegradabilními polymery v biomedicině jsou PLA, PCL a jejich kopolymery. Tyto polymery degradují v lidském těle na netoxické konečné produkty hlavně pomocí hydrolýzy za dobu několika týdnů až měsíců. Doba rozkladu závisí na průměrné molekulové hmotnosti, a poměru krystalické a amorfni fáze. [5]

4.2.1 SCAFFOLDY PRO NERVOVÉ SYSTÉMY

Biokompatibilní syntetické materiály jsou velmi často používány také jako scaffoldy pro nervové tkáně a to hlavně díky jejich biodegradabilitě a mechanickým vlastnostem. Zvlákněje ze např. z polyesterů jako např. PGA nebo PCL. Přírodními polymery užívanými pro výrobu elektrostaticky zvlákněných scaffoldů pro nervové tkáně jsou kolagen, želatina, laminin a chitosan. Léčba poškozených nervových tkání je v dnešní době pouhým biomedicínským konceptem, který však v budoucnosti ovlivní spousty lidských životů. Je známo, že pro dosažení správného růstu nervové tkáně je rozhodující správně navržené mezibuněčné prostředí. Extracelulární matrix nervového systému se skládá z kolagenů typu I, II, III, IV a V, glykoproteinů a mukopolysacharidů. Velká část tohoto mezibuněčného prostoru je charakteristická svou vláknitou strukturou. Velikost těchto biologických vláken se pohybuje v řádech nanometrů až milimetrů. Proto je pro úspěšnou regeneraci nervové tkáně vyvinout scaffold s vláknennou strukturou. Electrospinning je pro toto využití ideální výrobní alternativou, protože dokáže vyrábět i nanovláknenné vrstvy. Nanovláknenné scaffoldy mají vlastnosti, pro které jsou velmi vhodnými pro využití v tkáňovém inženýrství CNS. Morfologie a architektura je stejná jako v přirozeném mezibuněčném prostředí, což je základem pro výrobu biokompatibilního scaffoldu, na kterém se buňky zachytí, diferencují a proliferují. Další důležitou vlastností nanovláken je jejich vysoká poróznost, která umožňuje správný transport tekutin mezi buňkami. Dále je velmi důležité, že technologií elektrospinningu je možné vytvořit nanovláknenné vrstvy z orientovaných vláken, což umožňuje řízený růst buněk. Navíc na orientovaných nanoscaffoldech můžeme pozorovat mnohem větší stupeň prorůstání nervové tkáně, než u náhodně orientovaných scaffoldech.

Vědci testovali chitosanový nano až mikro vláknenný scaffold ve tvaru válce pro léčbu 10 mm přerušení ischiatického nervu krysy. Senzorické funkce se začali obnovovat cca 8 týdnů po implantaci. Také axony se prodlužovaly skrze scaffold [11]. I přes dobré výsledky regenerace nervové tkáně se přírodní polymery často nahrazují syntetickými. Je tomu tak hlavně kvůli jejich lepším mechanickým vlastnostem. Naopak nevýhodu syntetických polymerů je nízká afinita buněk způsobená nízkou hydrofilitou. Nejlepší výsledky byly dosaženy na scaffoldech vyrobených z biosyntetických materiálů jako jsou např. směs PCL/želatina nebo PCL/kolagen. V těchto kompozitech funguje syntetický polymer jako opora s dobrými mechanickými vlastnostmi a přírodní polymer napomáhá buněčnému růstu.

Bylo zjištěno, že želatina zvyšuje hydrofilitu nanovláknenného PCL scaffoldu, kterou dodávají funkční karboxylové a amino skupiny. Poměr želatiny a syntetického PCL udává výsledné vlastnosti scaffoldu. Pokud scaffold obsahuje 50% želatiny, zvyšuje se jeho hydrofilita, tudíž i afinita buněk ke scaffoldu. Struktura scaffoldu však není dostatečně soudržná a rychlost biologického rozkladu je větší v porovnání s čistým PCL nebo kompozitem PCL/želatina 70:30, který se zdá být nejvhodnějším pro použití jako nervový scaffold. [6]

Velmi nadějnou alternativou v léčbě poranění míchy je tvorba orientovaných vláknenných scaffoldů, které zajistí buněčnou migraci a řízenou axonální regeneraci skrze gliové jizvy i oblast léze. Orientované PCL a PCL/želatina scaffoldy vyrobené technologií elektrostatického zvlákňování umožňují kontrolovanou orientaci nervových buněk a tím dokazují, že orientované nanovláknenné vrstvy jsou schopny zaručit orientaci neuronů. Studie také ukázaly, že směr prodlužování nervů je víceméně paralelní s orientací vláken. Diferenciace buněk mozečku neonatální myši byla větší u orientovaných scaffoldů než u těch náhodně orientovaných. Je tomu tak jak u samostatného PCL, tak i u jeho kompozitu s želatinou. Orientované scaffoldy je možné použít u poranění centrální i periferní nervové soustavy. Dočasné studie se zaměřovaly hlavně na hodnocení neurální proliferace, diferenciace a rozšiřování neuritů různých typů buněk kultivovaných na orientovaných scaffoldech vyrobených z různých polymerů a o různých vláknenných průměrech. Do současné doby bylo pro nervové tkáně použito mnoho syntetických i přírodních polymerů, ale nejpoužívanějšími jsou syntetické biodegradabilní polyestery jako homopolymer kyseliny polymléčné (PLLA), polyglykolová kyselina (PGA) a poly (ϵ -kaprolakton) (PCL). Testování růstu myších embryonálních kmenových buněk na scaffoldech z PCL dokázalo, že jejich diferenciace na neurony byla podstatně lepší na scaffoldech s orientovanými vlákny. Pro lidské Schwannovy buňky platí, že orientovaná vlákna napomohla k zarovnání cytoskeletu a buněčného jádra souběžně s vlákny. Také byl pozorován nárůst myelinového proteinu P0, což naznačuje, že pro zrání buňky bude orientovaný scaffold vhodnější než ten anizotropní (náhodně orientovaný) [12]. Obecně tedy studie potvrzují, že vláknenné scaffoldy usnadňují diferenciaci a orientovaná struktura napomáhá směrovému rozšiřování axonů.[8]

Průměr vláken může také ovlivnit přilnutí buněk k textilií, jejich proliferaci, migraci a diferenciaci. Studie dále dokázali zlepšenou diferenciaci buněk na nanovlákněch (300 nm) ve srovnání s mikrovláknem (1.25 μ m). Testovány byly buňky kmenové buňky mozečku neonatální myši. Navíc buňky na scaffoldech z nanovláken vykazovaly větší rozšiřování axonů. Obecně tedy studie ukázaly, že nanovláknena hrají důležitou roli v regulaci diferenciace kmenových buněk a jejich proliferaci [8].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část je rozdělena na dvě hlavní části. První část se zabývá sestavením kvalitního zvlákňovacího zařízení podle technologie Nanospider (viz. Kapitola č 2.3.) a výrobou nanovláknenných scaffoldů sestávajících se převážně z jednosměrně orientovaných vláken.

Práce se ve svém počátku věnuje návrhu a výrobě sběrné elektrody pro elektrostatické zvlákňování. Kolektor byl navrhnut tak, aby se na jeho povrchu tvořila vrstva převážně jednosměrně orientovaných nanovláken. Druhy kolektorů pro tuto technologii byly popsány v kapitole č. 2.5.3.. V další fázi se práce věnuje sestavení zařízení pro zvlákňování, testování rychlosti otáčení kolektoru, úpravám zvlákňovacího zařízení pro dosažení požadované rychlosti otáčení a výrobě nanovláknenné vrstvy sestávající se převážně z orientovaných vláken.

Poslední částí experimentu je výroba scaffoldů z nanovláknenných vrstev a jejich testování v buněčné laboratoři na prorůstání myších fibroblastů (konkrétní označení „3T3“).

5.1 ZAŘÍZENÍ PRO TVORBU ORIENTOVANÝCH NANOVLÁKENNÝCH VRSTEV

Pro tvorbu nanovláknenné vrstvy byla zvolena technologie Nanospider popsaná v kapitole 2.3., která se vyznačuje mnohem větší výrobností v porovnání s typy zvlákňování „z jehly“ a „z hrotu“ (viz. Kap. 2.1. a 2.2.). Jako první elektroda byl použit tzv. strunový váleček připojený ke zdroji vysokého napětí s kladnou polaritou a umístěný v polyetylenové vaničce obsahující polymerní roztok. Druhou elektrodou je kolektor válcového tvaru rotující vysokou rychlostí kolem své osy. Na hladině roztoku na strunách válečku dochází k destabilizaci jeho částic při dosažení nadkritického napětí na elektrody a poté se důsledkem elektrostatických sil formují tzv. Taylorovy kužely, z nichž se ke kolektoru přitahují polymerní proudy.

5.1.1 NÁVRH KOLEKTORU

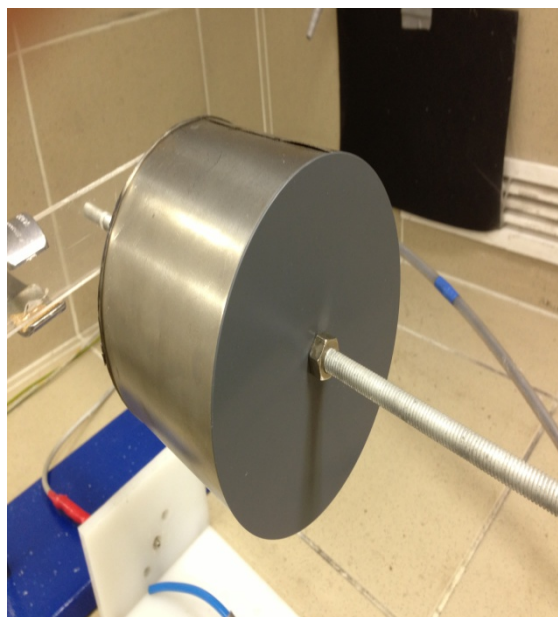
Na základě studií, které se zabývaly výrobou scaffoldů pro tkáňové inženýrství nervových systémů byl navržen kolektor, na kterém se zachytávala orientovaná vlákna. Struktura scaffoldu s orientovanými vlákny určuje nervovým buňkám směr k tzv. buněčné migraci, což znamená pohyb buněk po pevné podložce. Takto fungují scaffoldy jak pro

centrální tak i pro periferní nervovou soustavu. Tyto textilie by v budoucnu mohli plně rekonstruovat poškozenou míchu a obnovit tak veškerá přerušená nervová spojení. Bylo dokázáno, že orientovaná vlákna, vyrobená při 1000 otáčkách za minutu, měla mnohem lepší vlastnosti v růstu nervových buněk, než vlákna náhodně orientovaná [8]. Cílem této bakalářské práce bylo dosáhnout minimálně stejné rychlosti otáčení.

Základem pro výrobu speciálního kolektoru byla tzv. komínová zděř z nerez o průměru 180 mm. Nejprve bylo potřeba odříznout rozšířenou hranu zděře a vytvořit tak souměrný válec o průměru 180 mm a výšce 100 mm. Po odříznutí musela být hrana válce obroušena do rovna. Protože vzniklý válec nemá podstavy, bylo potřeba vytvořit kruhové bočnice z nevodivého materiálu, které budou sloužit k odizolování výsledného kolektoru od ostatních částí zařízení. Bočnice kruhového tvaru s průměrem 180 mm byly vyrobeny z polyvinylchloridové desky tloušťky 5 mm. Do jejich středu byly vyvrtány otvory pro závitovou tyč o průměru 6 mm. Tato tyč vytvořila osu kolektoru. K závitové tyči byly přidány dvě matky (rozměr M6), které měly za úkol stabilizovat sestavený kolektor.



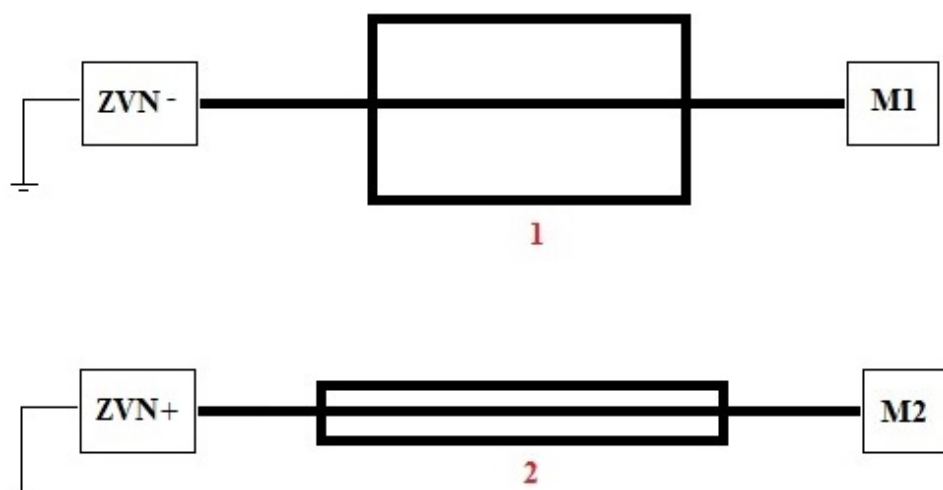
Obrázek 8 Komínová zděř o průměru 180 mm



Obrázek 9 sestavený kolektor

5.1.2 SESTAVENÍ ZVLÁKŇOVACÍHO ZAŘÍZENÍ

Po navržení kolektoru bylo potřeba navrhnout celkový vzhled soustavy pro elektrostatické zvlákňování orientovaných vrstev. Následně byl v digestoři sestaven prototyp č. 1 podle schématu na obrázku č. 10. Základ zařízení tvoří dvě nabité elektrody, jako první byl zvolen strunový váleček, koná rotační pohyb a tím se na povrchu strun tvoří tenký film polymerního roztoku. Ve vzdálenosti 18 cm nad kladně nabitým válečkem se nacházela opačně nabitá elektroda zvaná kolektor, která byla připevněna k hřídelovému míchadlu zn. Eurostar, označeném na obrázku č. 10 jako M1. Mezi těmito elektrodami se tvořilo elektrostatické pole, které mělo za následek přitahování polymerních vláken z povrchu strun otáčejícího se válečku směrem ke kolektoru. Na stranách strunového válečku se tvořila místa s větší intenzitou elektrického pole, která ovlivňovala tvorbu nanovláken. Tato místa proto musela být při výrobě vrstev přelepena stříbrnou lepicí páskou s textilní výplní tak, aby se vlákna tvořila pouze ze střední části válečku. Lepicí páska byla následně nahrazena dvěma jednoduchými konstrukcemi z polymethylmethakrylátu (PMMA). Bylo také potřeba zvolit optimální rychlost otáčení válečku, ta se pohybovala kolem 60 otáček za minutu.



Obrázek 10 - Základní schéma zvlákňovací soustavy
1 - kolektor 2 - váleček, M1, M2 – zařízení na otáčení,
ZVN-, ZVN+ - zdroje vysokého napětí

Prvním problémem zvlákňovací soustavy při chodu bylo nepravidelné otáčení strunového válečku a jeho časté vypadávání z vaničky s polymerem. Bylo zjištěno, že hlavní příčinou tohoto problému je špatné převádění otáčení z motoru M2 na strunový váleček. Bez

vyřešení tohoto problému by nebylo možné v práci pokračovat, protože pokud se váleček neotáčel pravidelně, docházelo k přerušování nebo úplnému zastavení zvlákňování. Stroj M2 na otáčení válečku musel být tedy dovybaven speciálním nástavcem přímo na použitý váleček (viz. Obrázky č. 11 a 12). Tento nástavec byl vyroben z polypropylenové trubičky o průměru 5 mm, ve které byl vytvořen závit stejný jako na závitové tyči tvořící osu válečku. To zajistilo pravidelné otáčení strunového válečku a tím se také odstranil problém s přerušováním zvlákňování. Bylo tedy možné zvlákňovat polymerní roztok bez přerušení.

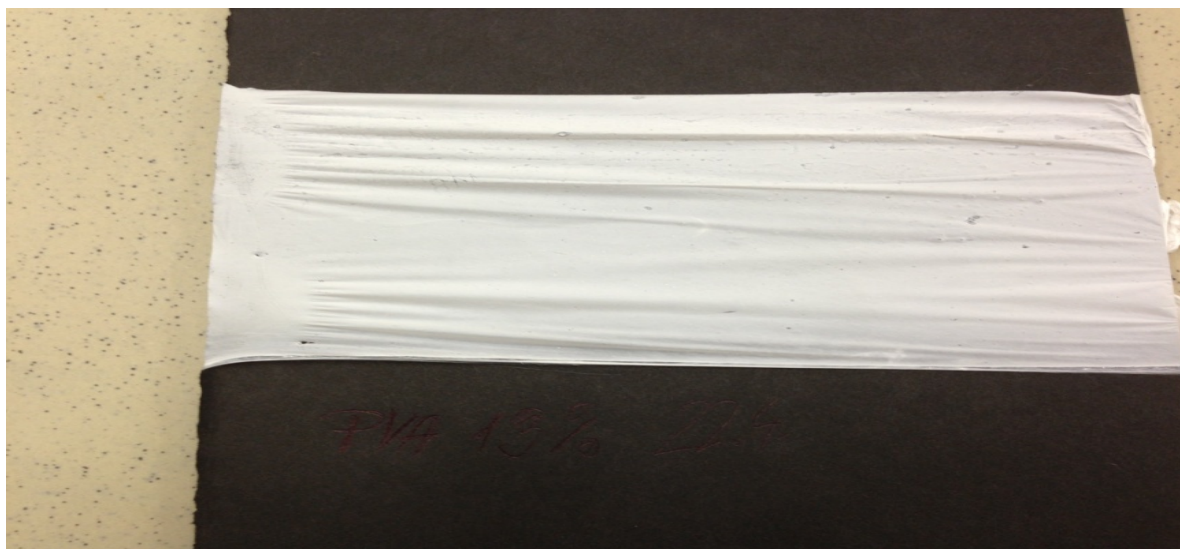


Obrázek 11 převod otáčení („bužírka“)



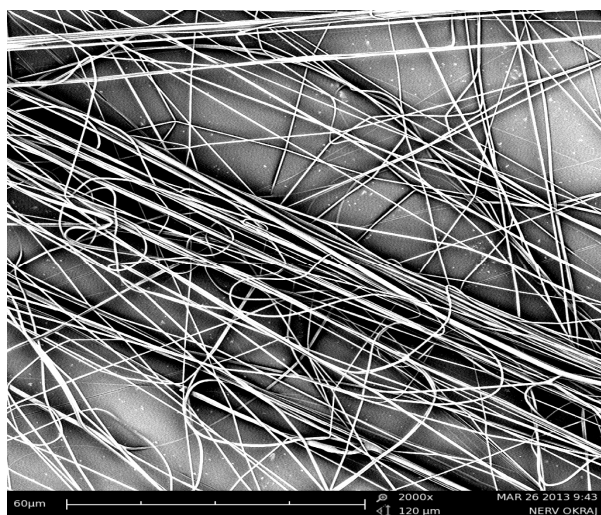
Obrázek 12 vylepšený převod otáčení

Dosažená rychlost otáčení kolektoru se nejprve pohybovala v rozmezí okolo 400 ot. /min. Bylo očekáváno, že se i při této rychlosti rotace kolektoru budou tvořit orientovaná vlákna. Jako testovací roztok byl zvolen 13 hm. % roztok PVA ve vodě. Vzdálenost kolektoru od válečku byla při zvlákňování roztoku PVA 18 cm. Aplikované napětí bylo na kolektoru -15 kV a na válečku +15 kV. Otáčky, při kterých docházelo k deponování vytvořených vláken na kolektoru, byly cca 400 ot. /min. Roztok byl zvlákňován velmi snadno, výroba vrstvy trvala necelých 5 minut. Vyrobené vlákenná vrstva je zobrazena na obrázku č. 13.

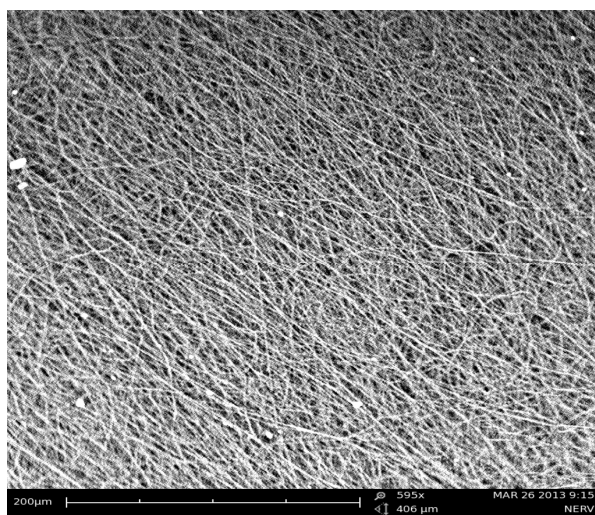


Obrázek 13 nanovláknenná vrstva z 13 hm. % PVA

Dále bylo zjišťováno, do jaké míry se tvořila orientovaná vlákna. Pomocí elektronového skenovacího mikroskopu Tescan Vega byla vrstva analyzována. Na snímcích (obrázky č. 14 a 15) z elektronového mikroskopu bylo možné pozorovat orientaci vláken, což dokázalo, že při použití rotačního válce jako kolektoru je možné připravit orientované vláknenné vrstvy i při rychlosti otáčení 400 ot. /min. Ze snímků lze usoudit, že byla vrstva tvořena orientovanými vlákny jen částečně, a proto bylo nutné navrhnout úpravy zařízení k dosažení vyšší rychlosti otáčení kolektoru.



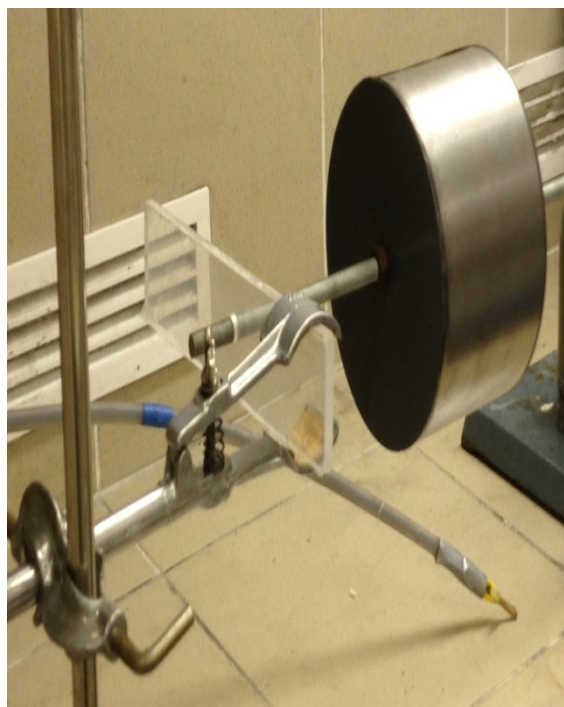
Obrázek 14 PVA 13 hm. % zvětšení 2000x,
měřítko 60 μm



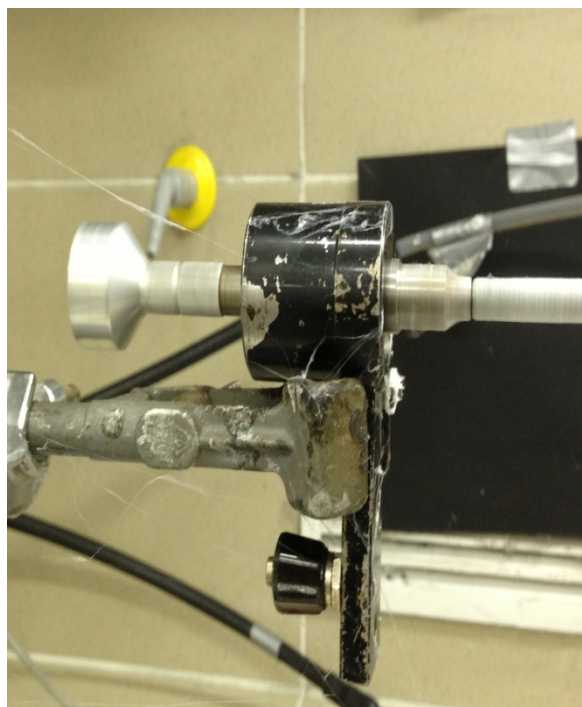
Obrázek 15 PVA 13 hm. % zvětšení 595x,
měřítko 200 μm

5.1.3 NÁVRH A REALIZACE ÚPRAV ZVLÁKŇOVACÍ SOUSTAVY

Při rychlostech otáčení kolektoru přesahujících 400 ot. /min byla soustava značně nestabilní a docházelo k silné rezonanci na mechanismu uchycení kolektoru. Uchycení závitové tyče s kolektorem bylo sestaveno pomocí stojanů a umělohmotné destičky s vyvrtaným otvorem pro závitovou tyč o průměru 6 mm (viz. Obrázek č. 16). Pro omezení vlastní rezonance zařízení a možnost využití větší rychlosti otáčení byly stojany připevněny pomocí držáků k pevným částem digestoře. Původní destičku z polymethylmethakrylátu s otvorem bylo pro uchycení závitové tyče použito kuličkové ložisko (viz. Obrázek č. 17), které dodává celému zařízení větší stabilitu a umožňuje otáčet kolektorem větší rychlostí. Finální verze zvlákňovací soustavy dokázala vyrábět nanovláknenné vrstvy při rychlosti otáčení kolektoru až 1250 ot. /min.



Obrázek 16 uchycení kolektoru (PMMA destička)

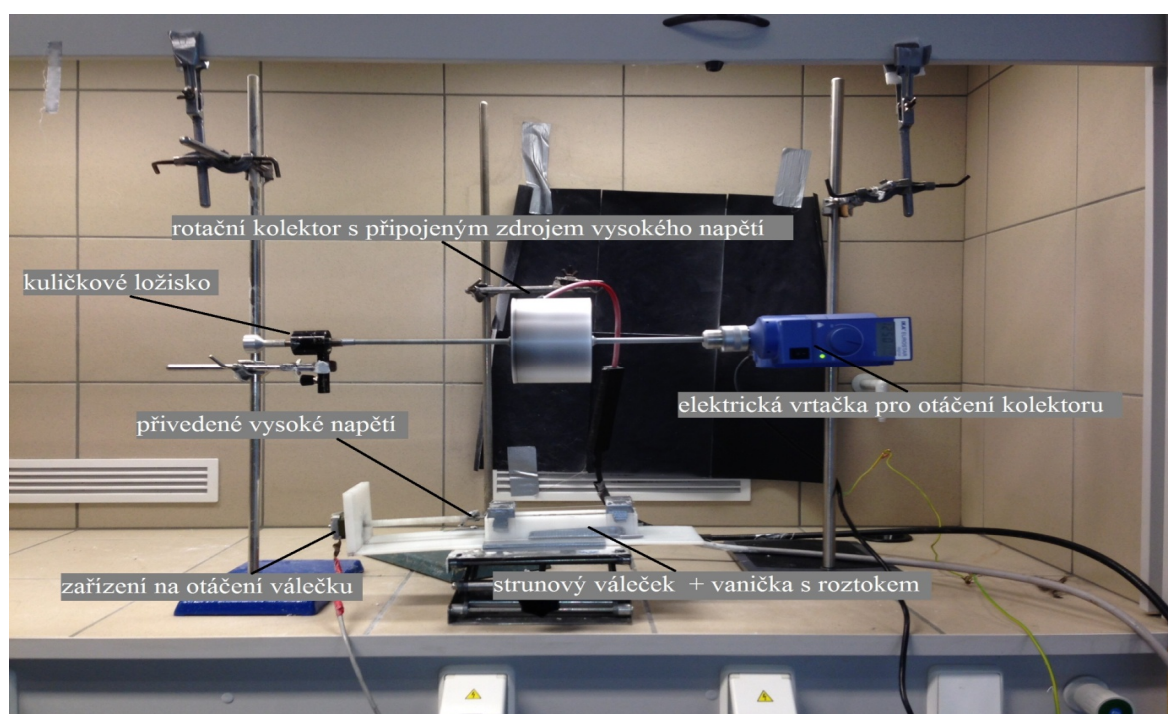


Obrázek 17 vylepšení uchycení kolektoru pomocí kuličkového ložiska

5.1.4 ZVLÁKŇOVÁNÍ BIODEGRADABILNÍHO POLYMERU

Polymer zvolený jako nejvhodnější pro výrobu scaffoldu byl poly(ϵ -kaprolakton), v angličtině poly(ϵ -caprolactone) (PCL). Jeho hlavními vlastnostmi užitečnými pro vývoj scaffoldů jsou biokompatibilita a biodegradabilita. Použit byl polymer o průměrné číselné molekulové hmotnosti 45 000. Roztok, který byl použit ke zvlákňování, měl koncentraci 17 hm. %. Jako rozpouštědlo byla použita směs chloroformu a etanolu v poměru 8:2. Vysoké napětí, které bylo aplikováno na kolektor, mělo hodnotu -9,9 kV. Napětí aplikované na váleček to bylo +30 kV. Elektrody byly od sebe navzájem vzdálené 18 cm. Orientované nanovláknenné vrstvy byly vyrobeny za těchto laboratorních podmínek: vlhkost vzduchu 44,6% a teplota 22,2 °C. Zařízení umístěné v digestoři vyrábělo vrstvy při rychlosti rotace kolektoru 1200 otáček za minutu.

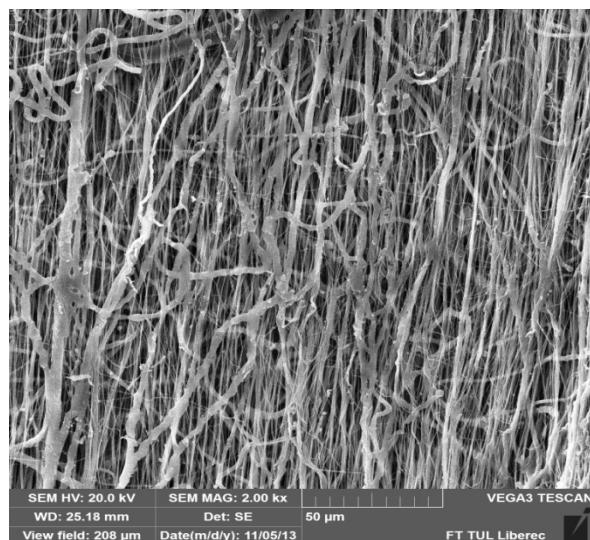
Celkové schéma zvlákňovacího zařízení je zobrazeno na obrázku č. 18. Jedná se o poslední verzi zařízení. Takto sestavené zařízení bylo použito ke zvlákňování roztoku polykaprokaltonu (17 hm. %)



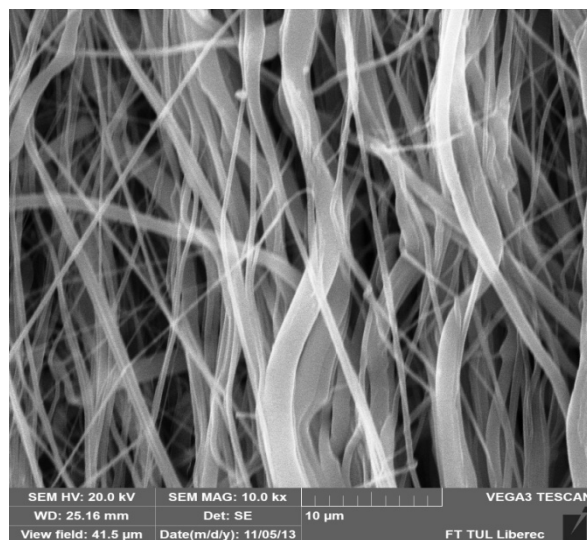
Obrázek 18 Schéma zvlákňovacího zařízení

5.2 ANALÝZA VYROBENÝCH NANOVLÁKENNÝCH VRSTEV

Vyrobené vlákenné vrstvy byly analyzovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (Tescan Vega) a softwaru NIS Elements.



Obrázek 19 SEM snímek PCL vrstvy (zvětšení 2000x, měřítko 50 µm)



Obrázek 20 SEM snímek PCL vrstvy (zvětšení 10000x, měřítko 10 µm)

5.2.1 PRŮMĚRY VLÁKEN

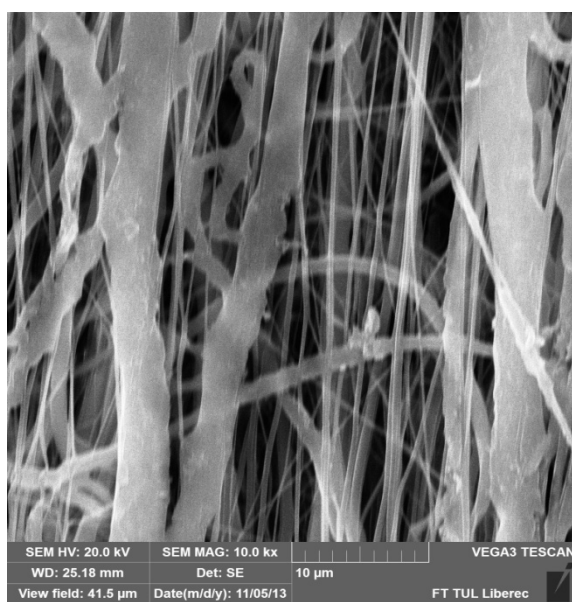
Byly proměřeny tři vzorky vrstev polykaprolaktonu (17 hm. %). Bylo zjištěno, že vrstvy jsou tvořeny z vláken o průměrech v řádech nanometrů a mikrometrů.

Na obrázek č. 19 je orientovaná vrstva z PCL se zvětšením 2000 krát. Měření pomocí softwaru NIS Elements prokázalo přítomnost nanovláken. Průměrná hodnota vlákenného průměru byla 830,02 nm. Směrodatná odchylka 821,01 nm ukazuje na velké rozdíly ve vlákenných průměrech ve vlákenných průměrech. Nejmenší průměr naměřený na tomto vzorku byl 154,94 nm a naopak největší 3,84 µm. U obrázku č. 20 byla průměrná hodnota vlákenného průměru 508,49 nm se směrodatnou odchylkou 691,44 nm. Minimální hodnota průměru vlákna byla 167,24 nm a maximální 4,46 µm. Další hodnoty jsou uvedeny v příloze bakalářské práce. Vlákná o průměrech v řádu stovek nanometrů ($1 \text{ nm} = 1 \cdot 10^{-9} \text{ m}$) můžeme zkráceně označovat jako nanovlákná a vlákná o průměrech jednotek mikrometrů ($1 \text{ µm} =$

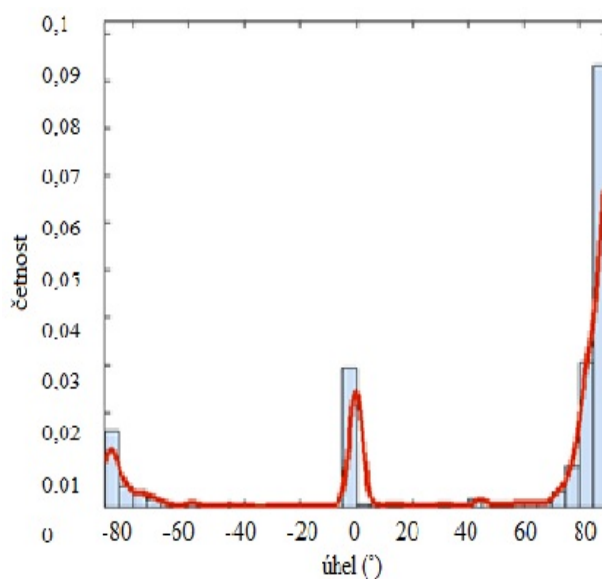
$1 \cdot 10^{-6}$ m) označujeme jako mikrovlákná. Vláknenné vrstvy byly tedy podle analýzy tvořeny jak nanovláknny tak mikrovláknny. Mikrovlákná dodávají struktuře lepší mechanické vlastnosti.

5.2.2 ORIENTACE

Vzorky z elektronového mikroskopu byly následně analyzovány na míru jednosměrné orientace vláken a byly vytvořeny tzv. směrové růžice. Bylo zjištěno, že vlákna jsou ve vláknenné vrstvě orientována převážně požadovaným směrem. Na obrázku č. 21 je zobrazen snímek z elektronového mikroskopu, který byl proměřen na vláknennou orientaci pomocí softwaru MatLab. Na obrázku č. X2 je zobrazen histogram distribuce směrů vláken, který ukazuje četnost míst orientovaných různými směry. Je z něho možné pozorovat, že největší podíl ve vláknenné vrstvě zastávají vlákna orientovaná. Tedy vůči vodorovné ose pootočená o $80 - 90^\circ$. Některá vlákna byla orientována ve směru vodorovné osy. Tato vlákna dodávala vláknenné vrstvě na pevnosti. Červená křivka značí tzv. neparametrický jádrový odhad četností (Kernel density estimation).



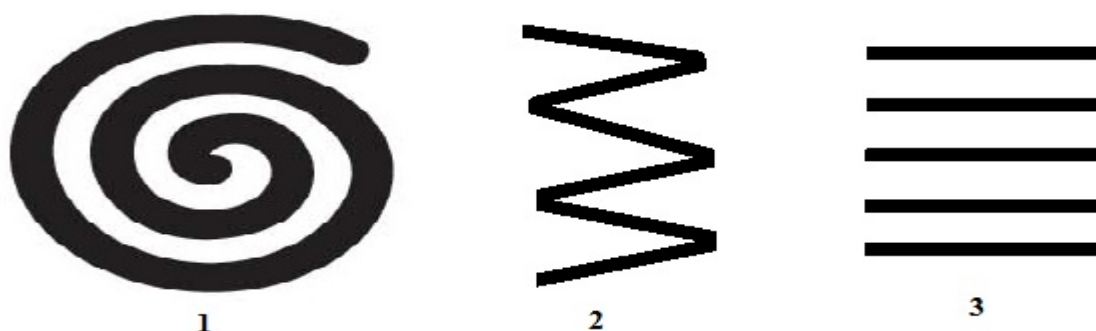
Obrázek 21 SEM snímek PCL vrstvy (zvětšení 2000x, měřítko 50 µm)



Obrázek 22 histogram četnosti různých úhlů orientace vláken

5.3 PŘÍPRAVA FINÁLNÍCH VZORKŮ

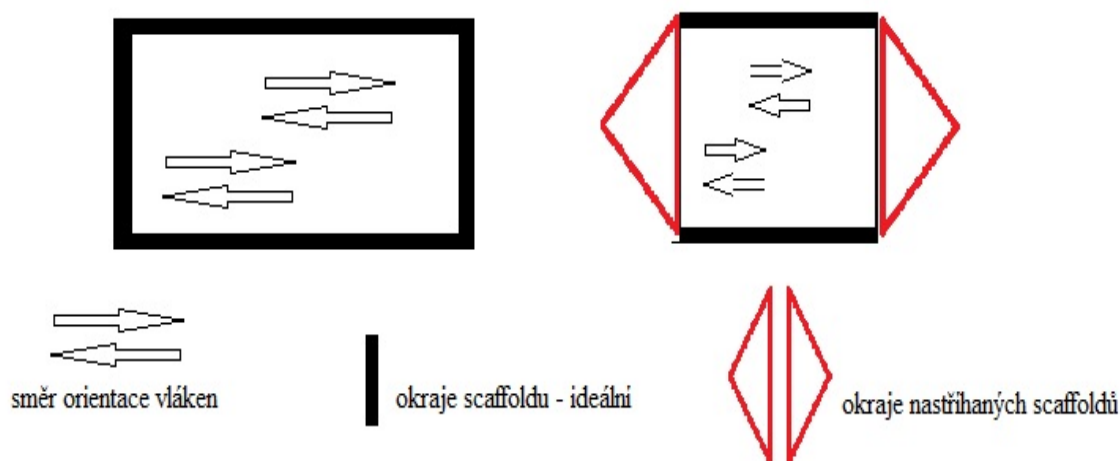
Orientované vrstvy byly nastříhány kolmo na směr orientace vláken na délku 5 cm. Takto vytvořené části vrstev byly poskládány různými způsoby tak, aby na konci měli tvar válce a vlákna byla ve válci orientována ve směru jeho výšky. Druhy skládání dostaly pracovní názvy „roll“ - **A**, „zig zag“ - **B** a „tiramisu“ - **C** (viz. Obrázek č. 23).



Obrázek 23

schéma průřezu třech typů finálních vzorků, 1 – roll (A), 2 - zig zag (B), 3 – tiramisu (C)

Vytvořené skládané vrstvy byly následně nastříhány na finální scaffoldy o velikosti přibližně 2,5 mm. Scaffoldy byly umísťovány do jamek v polystyrenové mikrotitrační destičce. Mikrotitrační destička s plochým dnem obsahovala 96 jamek (12 jamek v 8 řadách). Celkový rozměr použité mikrotitrační destičky byl 86 x 128 x 18 mm. Průměr jedné jamky byl 7 mm a její hloubka 9,7 mm. Z těchto rozměrů je patrné, že scaffold musel mít průměr o něco menší než je průměr jamky v mikrotitrační destičce. Stříhání složených vrstev na takto malé části bylo složité. Vrstvy byly velmi jemné a nůžky ani skalpel neměly dostatečnou ostrost pro oddělení scaffoldů od vrstvy bez mechanického poškození. Okraje finálních vzorků se slepovaly k sobě a nebylo možné vytvořit dostatečně otevřenou strukturu pro růst buněk. Některé ze scaffoldů se podařilo pomocí pinzety do určité míry vylepšit, ale některé zůstaly uzavřené. Uzavřené okraje nastříhaných vzorků jsou schematicky naznačeny na obrázku č. 24.



Obrázek 24 okraje s nežádoucím slepením po stříhání skládaných vrstev na finální vzorky.

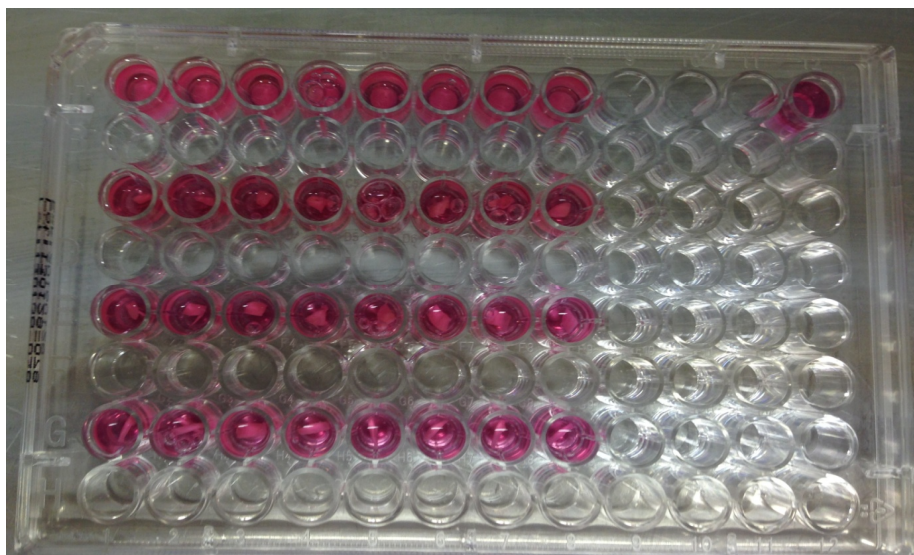
5.4 TESTOVÁNÍ VZORKŮ NA PRORŮSTÁNÍ BUNĚK

Nervové buňky nebyly v biologické laboratoři KNT k dispozici, a proto byly zvoleny myší fibroplasty, konkrétně pod označením 3T3. Fibroplasty jsou základní buňky vazivové tkáně. Buňky byly původně kultivovány v polystyrenových kultivačních lahvíčkách. Bylo použito médium s označením DMEM. Jak popisuje kapitola 4.1. (buněčné kultury), pro správné množení buněk je potřeba zajistit buňkám dostatečné množství živin a další kultivační podmínky. Je tedy třeba měnit médium a buňky pasážovat. Médium obsahuje 90 % DMEM, bovinní sérum – fetal bovine serum (FBS, krevní sérum z kravského plodu) s růstovými hormony (10 %). Následně byl do média přidán 1 ml antibiotik. Kultivační lahvíčka s buňkami byla pro výměnu média přenesena do tzv. flow boxu, který tvoří bariéru mezi prostředím laboratoře a vnitřním prostředím boxu pomocí vzdušného proudění. Po otevření víka boxu bylo potřeba box zapnout a počkat na ustálení vzduchové bariéry. Před vlastní prací v boxu bylo také třeba připravit veškeré potřebné nástroje a materiály, jako jsou sterilní pipety, nádoby na odpad a roztok média DMEM s bovinním sérem a antibiotiky. Lahvičku s roztokem DMEM bylo nutné oškrábat etanolem pro minimalizaci rizika kontaminace prostředí ve flow boxu. Staré médium bylo odstraněno z lahvíčky pomocí tzv. Pasteurovy pipety a následně bylo nahrazeno novým. Kultivační lahvíčka byla umístěna zpět do inkubátoru. Tento postup se opakoval po dvou až čtyřech dnech do doby, kdy docházelo ke kontaktní inhibici (viz. Kapitola 4.1.4.) a buňky se přestávali množit. V dobu, kdy bylo pod mikroskopem vidět zaplnění dna lahvíčky buňkami, se provádělo tzv. pasážování.

Pro pasážování byla kultivační lahvička opět přenesena do připraveného flow boxu s veškerými pomůckami. Nejprve bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS puforem. Následně byl přidán trypsin (2 ml) a kultivační lahvička byla umístěna na dvě minuty do inkubátoru. Poté bylo zkontrolováno oddělení buněk ode dna lahvičky pomocí mikroskopu a lehkým sklepaním bylo dosaženo úplného oddělení buněk od lahvičky. Následně bylo k buňkám přidáno nové médium a buňky byly resuspendovány. Pomocí automatické počítačky byla určena koncentrace buněk a do nových kultivačních lahviček bylo nepipetováno množství přibližně 1500 buněk a k nim bylo přidáno médium.

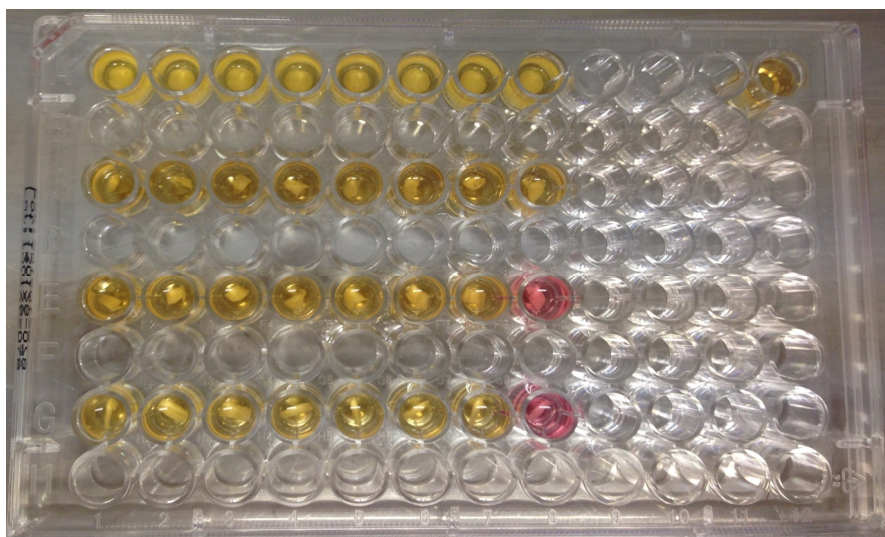
5.4.1 BUNĚČNÉ TESTOVÁNÍ FINÁLNÍCH VZORKŮ

Scaffoldy byly nejprve zasazeny do sterilní polystyrenové mikrotitrační destičky s kultivačními jamkami (96 jamek – 8 řad po 12 jamkách) a půl hodiny desinfikovány pomocí etanolu. Následně byl do jamek přidán fosfátový pufr (PBS, pH 7,4), který udržoval scaffoldy vlhké a stabilizoval jejich pH. Poté byly ke scaffoldům přidány buňky, které byly získány pomocí pasážování již rozrostlé buněčné kultury. Nejprve bylo nutné pomocí počítačky buněk (značka!!) určit koncentraci buněk v médiu. Následně bylo na každý scaffold nasazeno přibližně 1500 buněk. K buňkám bylo následně přidáno také médium (200 ml DMEM vč. přísad), které buňkám dodávalo živiny a mikrotitrační destička se scaffoldy a buňkami byla uložena do termálního boxu (Sartorius Stedim, atmosféra s 5% CO₂), kde mají buňky ideální teplotu pro růst a množení, tj. 37°C. Na mikrotitrační destičce byly obsazeny čtyři řady jamek. První řada obsahovala osm vzorků neorientovaných scaffoldů z polykaprolaktonu vyrobených technologií Nanospider. Každá další řada obsahovala jeden druh finálních vzorků (A, B a C) také po osmi kusech. Na sedm vzorků z každé řady byly nasazeny buňky a do jedné jamky se scaffoldem bylo přidáno pouze médium (tzv. negativní kontrola). V pravém horním rohu byly nasazeny pouze buňky bez použití scaffoldu, tzv. pozitivní kontrola. (viz. Obrázek č. 25)



Obrázek 25 mikrotitrační destička po nasazení buněk na scaffoldy

Po určité době buňky z média vyčerpaly živiny a bylo možné pozorovat změnu zbarvení média z červené na oranžovou (vlivem změny pH). U jamek, které obsahovaly pouze médium, se změna zbarvení neprojevila (viz. Obrázek č. 26 – pozn. Tato konkrétní destička obsahuje pouze dvě negativní kontroly, jedná se o chybu v nasazování).



Obrázek 26 mikrotitrační destička po několika dnech kultivace

5.4.2 VÝSLEDKY BUNĚČNÉHO TESTOVÁNÍ

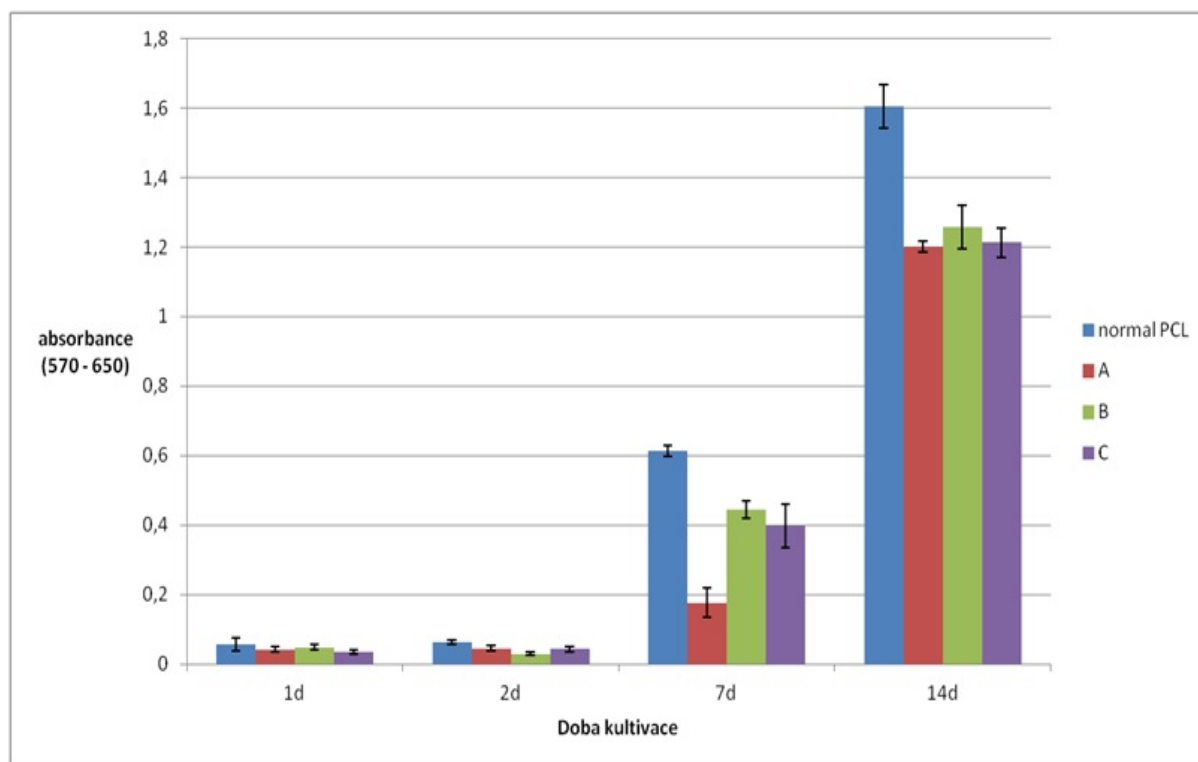
Mikrotitrační destičky se vzorky byly testovány pomocí tzv. MTT testu, který reflektuje metabolickou aktivitu buněk, která indikuje jejich množení. Jako další metoda testování prorůstání a množení buněk na scaffoldech byla použita analýza pomocí fluorescenční mikroskopie (Nikon Eclipse TI). Tyto metody analýzy byly provedeny ve čtyřech různých fázích buněčné kultivace. Nejprve první den po nasazení buněk a následně druhý, sedmý a čtrnáctý den.

MTT test

„Tato metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdicovitého tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 a 650 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk).“ [citace - <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>]

Nejprve bylo nutné odsát médium ze všech jamek mikrotitrační destičky. Do nových jamek bylo napipetováno 50 µl MTT + 150 µl DMEM. Do těchto jamek byly následně přeneseny vzorky scaffoldů. Z osmi vzorků v každé řadě bylo přeneseno pouze pět z nich. Ostatní vzorky sloužili pro testování na fluorescenčním mikroskopu. Následně byla mikrotitrační destička přenesena zpět do inkubátoru, ve kterém působil roztok MTT a DMEM na buňky po dobu třech hodin. Poté byl roztok odstraněn z jamek a nerozpustný formazan byl převeden na rozpustný pomocí pipetování 200 µl isopropanolu okyseleného kyselinou chlorovodíkovou. Pomocí pipety byla utvořená směs promíchána a destička se vzorky tak byla připravena na spektrofotometrický test. Test byl prováděn na spektrofotometru značky XXX a vyhodnocován softwarem Gen 5.0, který data ze spektrofotometru exportoval do programu MS Excel.

Tento postup byl opakován každý testovací den a výsledky byly následně zpracovány do grafu. Hodnota absorbance světla při vlnové délce 650 nm byla odečtena od hodnoty absorbance světla vlnové délky 570 nm. Následně byl určen průměr těchto hodnot a směrodatná odchylka. Výsledky byly zpracovány do grafu č. 1.

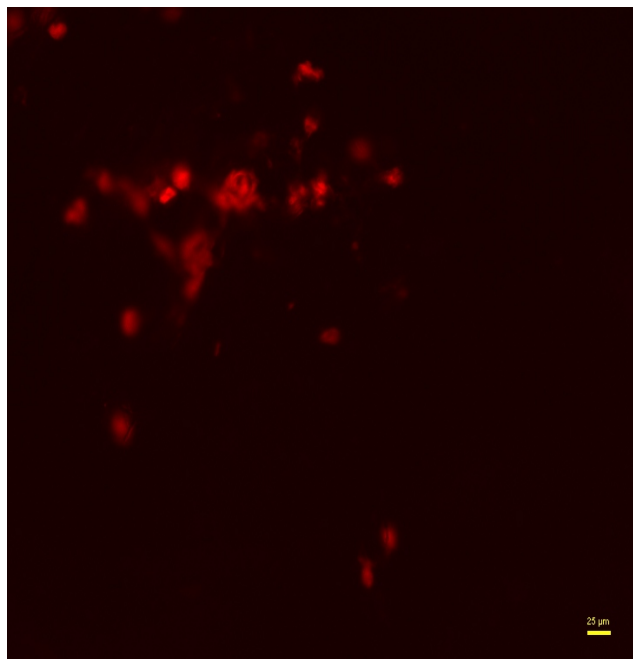


Graf 1 výsledky MTT testu

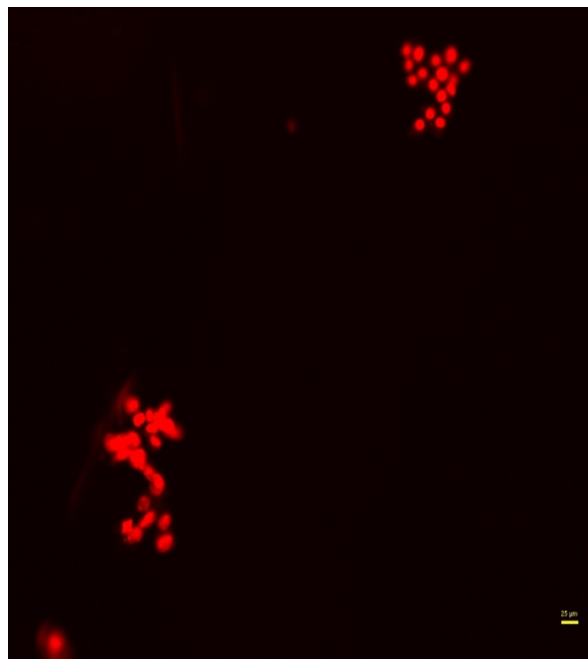
Z grafu lze vyčíst, že nejlépe se buňky množily na vzorcích neorientovaných vláken, což můžeme vysvětlit tím, že tyto vzorky měli jako jediné správně otevřenou strukturu. Ostatní vzorky byly uzavřené z důvodu působení nůžek při jejich stříhání (viz. Kapitola 5. 3. a obrázek č. 24). Ze vzorků vyrobených na sestaveném zvlákňovací zařízení se ukázal jako nejlepší vzorek B, kterým podle MTT testu prorostl největší počet buněk. Rozdíly mezi těmito vzorky jsou však zanedbatelné. Podařilo se tedy dokázat, že byly vyrobeny orientované nanovláknenné nosiče, které opravdu mohou sloužit jako scaffoldy pro růst tkání. Avšak bylo zjištěno, že technika výroby těchto vzorků není dokonalá a pro další zkoumání by bylo vhodné vymyslet techniku, která dokáže tvořit scaffoldy, které mají strukturu otevřenou na obou koncích a nejsou poškozené mechanickým oddělováním. Vzorky neorientovaných scaffoldů jsou z vrstev vykrajovány pomocí tzv. děrovačky, což je pro neorientované scaffoldy dostačující. Je tak vytvořeno malé kolečko, které může sloužit jako scaffold. Pokud bychom děrovačku použili na orientované vrstvy, nedosáhli bychom požadovaného směru orientace ani tvaru scaffoldu (válec vyplněný vlákny orientovanými ve směru od jedné podstavy ke druhé).

Analýza pomocí fluorescenčního mikroskopu

Vzorky pro analýzu pomocí fluorescenčního mikroskopu byly nejprve přeneseny do nové mikrotitrační destičky. Následně byly buňky fixovány pomocí metanolu. Fixace probíhala v lednici při teplotě 4°C po dobu deseti minut. Poté byly buňky propláchnuty PBS pufrem pro ustálení pH na hodnotu 7,4. Poté bylo ke vzorkům přidáno 100 μ l propidium jodidu, což je fluorescenční interkalační činidlo, které se dostává do struktury DNA buněk, a díky němu můžeme buňky pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem. Při aplikaci propidium jodidu bylo potřeba pracovat ve tmě z důvodu možného poškození činidla jeho vysvícením. Následně byla destička se vzorky ponechána deset minut v boxu, který ji chránil před světlem. Poté bylo činidlo odstraněno a vzorky byly propláchnuty fosfátovým pufrem (PBS). Tímto způsobem byly vzorky připraveny pro analýzu fluorescenčním mikroskopem značky Nikon Eclipse TI. Výstup z mikroskopu byl zpracován pomocí softwaru NIS Elements a snímky byly exportovány ve formátu .JPEG. Rozdíl mezi druhým a třetím dnem kultivace není moc velký, ale je patrný. Můžeme ho pozorovat na obrázcích č. 27 a 28.

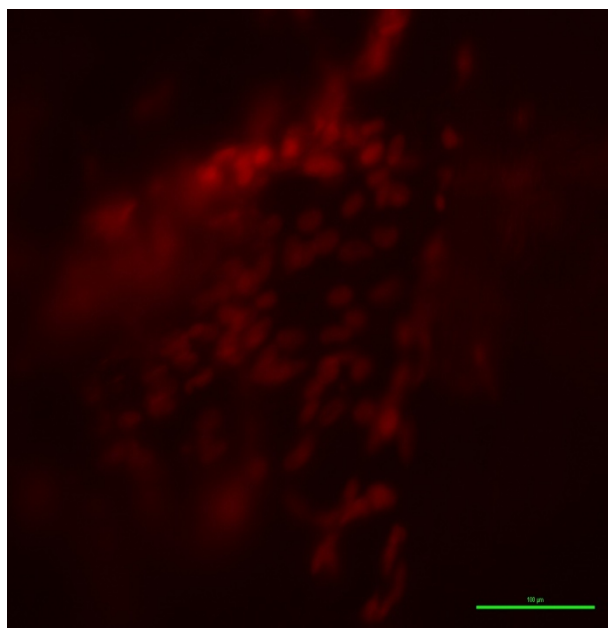


Obrázek 27 snímek z fluorescenčního mikroskopu, vzorek B, zvětšení 100x, druhý den kultivace, měřítko v pravém dolním rohu - 25 μ m

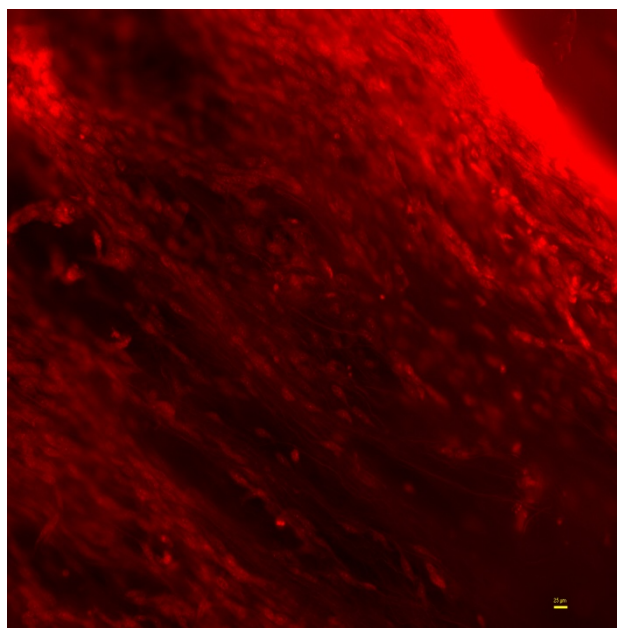


Obrázek 28 snímek z fluorescenčního mikroskopu, vzorek B, zvětšení 100x, třetí den kultivace, měřítko v pravém dolním rohu - 25 μ m

Na obrázcích č. 29 a 30 je zobrazen rozdíl mezi sedmým a 14. dnem kultivace. Zde lze vypořovat to, že buňky nerostou pouze na svrchní vrstvě scaffoldu, ale dostávají se i do vnitřní struktury. Buňky, které nejsou vidět ostře, se dostaly do struktury scaffoldu. Na snímku 30 je velmi dobře patrná orientace buněčné tkáně paralelně s orientací nanovláken ve vláknenné vrstvě.



Obrázek 29 snímek z fluorescenčního mikroskopu, vzorek B, zvětšení 200x, osmý den kultivace, měřítko v pravém dolním rohu – 100 μm

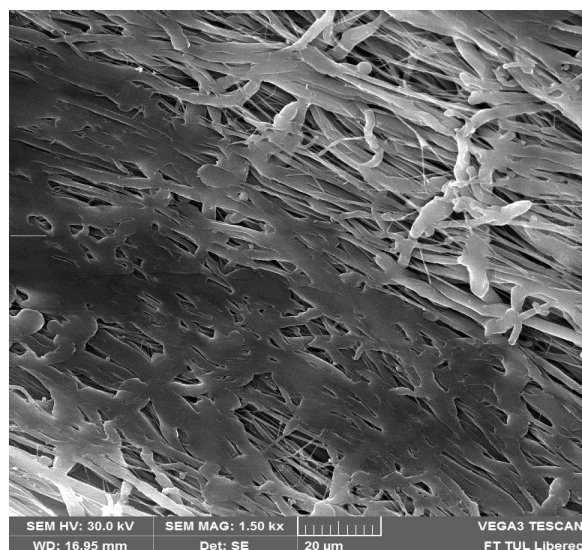


Obrázek 30 snímek z fluorescenčního mikroskopu, vzorek B, zvětšení 100x, 14. den kultivace, měřítko v pravém dolním rohu – 25 μm

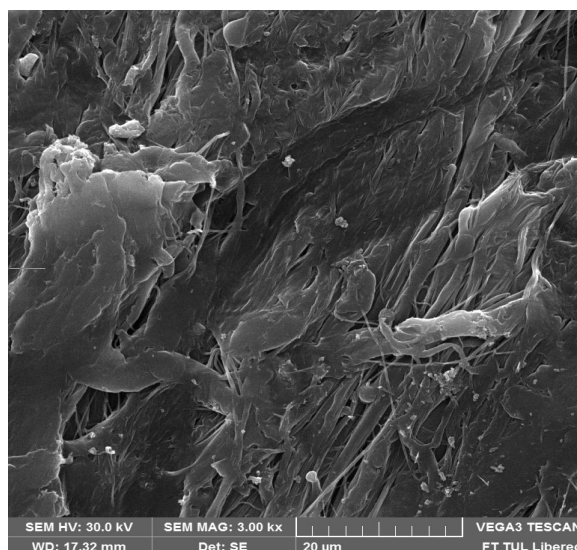
Analýza pomocí skenovacího elektronového mikroskopu

Vzorky pro analýzu pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byly nejprve přeneseny do nové mikrotitrační destičky. Následně byly buňky fixovány pomocí roztoku glutaraldehydu (2,5 %) v PBS. Fixace probíhala v lednici při teplotě 4 °C po dobu deseti minut. Po odsátí fixačního roztoku byly vzorky desinfikovány tzv. etanolovou řadou, což znamená, že se nejprve desinfikovalo 60 % etanolem po dobu 5 minut a následně byl použit etanol 70%. Tento postup se opakoval postupně přes etanol 80%, 90%, 96% až po etanol 100%. Následně byly vzorky vysušeny při pokojové teplotě. Po tomto postupu byly vzorky analyzovány skenovacím elektronovým mikroskopem Tescan Vega.

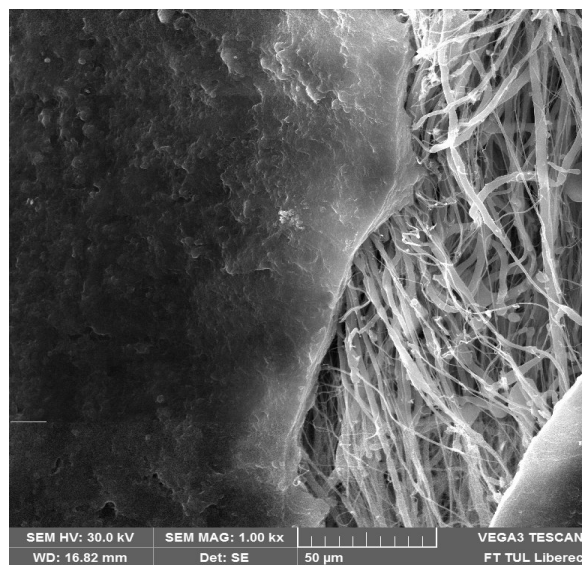
Na snímcích z elektronového mikroskopu jsou zobrazeny scaffoldy (vzorek B) s buněčnou kulturou v různých stádiích kultivace buněk s různým zvětšením.



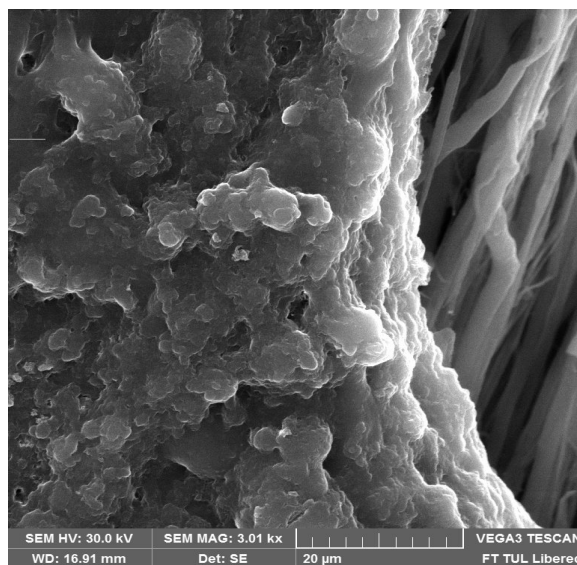
Obrázek 31 snímek z elektronového mikroskopu, vzorek B, zvětšení 1500x, třetí den kultivace, měřítko – 20 µm



Obrázek 32 snímek z elektronového mikroskopu, vzorek B, zvětšení 3000x, sedmý den kultivace, měřítko – 20 µm



Obrázek 33 snímek z elektronového mikroskopu, vzorek B, zvětšení 1000x, 14. den kultivace, měřítko – 50 µm



Obrázek 34 snímek z elektronového mikroskopu, vzorek B, zvětšení 3000x, 14. den kultivace, měřítko – 20 µm

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo navrhnout a sestavit zařízení pro výrobu nanovláknenných scaffoldů, které se sestávají převážně z jednosměrně orientovaných vláken. Práce se zaměřovala hlavně na návrh kolektoru pro sběr orientovaných vláken při výrobě technologií Nanospider. Byl navržen rotační kolektor, který byl vyroben z komínové zděři, která byla osazena bočnicemi vyrobenými z polyvinylchloridu. Tyto bočnice sloužily hlavně k izolaci kolektoru od dalších součástí zvlákňovacího zařízení. Celé zařízení bylo sestaveno v digestoři a byla testována jeho funkce. K testování byl použit roztok polyvinylalkoholu ve vodě (13 hm. %). Bylo zjištěno, že sestavené zařízení dokáže polymerní roztok zvláknit a vytvořit tak vláknennou vrstvu. Vrstva byla následně analyzována pomocí elektronového mikroskopu, který dokázal přítomnost orientovaných vláken. Dosažená rychlost otáčení kolektoru byla 400 otáček za minutu. Následně byly na zařízení aplikovány úpravy pro dosažení vyšší rychlosti otáčení. Rychlost otáčení kolektoru se po všech úpravách dostala na hranici 1250 otáček za minutu. Vyrobené vláknenné vrstvy byly analyzovány pomocí elektronového skenovacího mikroskopu. Bylo zjištěno, že vláknenná vrstva obsahuje vlákna v řádech od stovek nanometrů do jednotek mikrometrů a vlákna jsou ve vrstvě orientována převážně jedním směrem. Tím byl splněn cíl vyrobit nanovláknennou vrstvu převážně tvořenou orientovanými vlákny.

Z vyrobených nanovláknenných vrstev byly následně sestaveny scaffoldy. Byly použity tři různé typy skládání vrstev označené písmeny A, B a C, které byly popsány v kapitole 5. 3.. Složené vrstvy byly nastříhány na výsledné vzorky, které byly poté testovány na prorůstání a proliferaci buněčných kultur. Jako testovací buněčná kultura byly zvoleny myší fibroplasty s označením 3T3. V laboratoři byly buňky nasazeny na scaffoldy umístěné ve čtyřech mikrotitračních destičkách. Každá mikrotitrační destička sloužila pro testování v jiné fázi růstu buněčných kultur. Bylo provedeno testování metabolické aktivity buněk pomocí látky označované zkratkou MTT a spektrofotometru (viz. Kapitola č. 5.4.2. – MTT test). Metabolická aktivita poukazuje na množení buněk. Dále byly vzorky analyzovány pomocí fluorescenčního a skenovacího elektronového mikroskopu. Všechny tyto analýzy a testy byly provedeny první, druhý, sedmý a čtrnáctý den po nasazení buněk na scaffoldy. Nejlépe se podle testů dařilo buňkám růst a proliferovat na vzorcích s označením B s pracovním názvem „zig-zag“. Rozdíly mezi vytvořenými vzorky však nebyly nijak markantní, a proto nelze jednoznačně říci, že technologie skládání vláknenných vrstev má zásadní vliv na prorůstání buněk na finálních scaffoldech.

Analýza vzorků fluorescenčním mikroskopem dokázala, že orientace vláken ve vrstvě, udává buňkám směr proliferace. Bylo také zjištěno, že se buňky po několika dnech kultivace dokázaly dostat do struktury vyrobených scaffoldů. Bylo tedy dokázáno, že buňky dokážou prorůstat strukturou vyrobených nanovláknenných scaffoldů.

V porovnání se scaffoldy s náhodnou orientací vláken, vyrobenými na zařízení nanospider, však vyrobené vzorky prokazovaly menší metabolickou aktivitu. Na scaffoldech s náhodnou orientací se buňky uchytily mnohem rychleji a daleko lépe proliferovaly. Tuto skutečnost je možné vysvětlit tím, že okraje vyrobených orientovaných scaffoldů byly vlivem stříhání uzavřené, a proto se buňky dostávaly do struktury scaffoldu velmi obtížně. Problém se stříháním vláknenných vrstev byl popsán v kapitole č. 5. 3..

Tvorba orientovaných nanovláknenných scaffoldů je obtížná a bylo by vhodné se jí zabývat v dalších výzkumech, např. v diplomové práci. Zejména by bylo vhodné zaměřit se na konečnou fázi tvorby scaffoldů a nahradit stříhání nanovláknenných vrstev jinou technikou, která by dokázala vytvořit trojrozměrný scaffold s otevřenou strukturou. Po vyřešení tohoto problému by bylo vhodné scaffoldy otestovat na prorůstání a proliferaci nervových buněk.

7 LITERATURA

- [1] Doshi, J. and Reneker, D. H. (1995) "Electrospinning process and applications of electrospun fibers". *Journal of Electrostatics* **35** (151–160)
- [2] Bhardwaj, N., Kundu, S.C. (2009) "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique". *Biotechnology Advances* **28** (133-139)
- [3] Travis J. Sill, Horst A. von Recum (2008) "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering". *Biomaterials* **29** (1989-2006)
- [4] Ghasemi-Mobarakeh, L. a kol. (2008) "Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering". *Biomaterials* **29** (4532-4539)
- [5] Agarwal, S. a kol. (2008) "Use of electrospinning technique for biomedical applications". *Polymer* **49** (5603-5621)
- [6] Cao, H. a kol. (2009) „The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering“. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61** (1055-1064)
- [7] Ghasemi-Mobarakeh, L. a kol. (2010) "Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering". *Materials Science and Engineering* **30** (1129-1136)
- [8] Lee, Y.S., Livingston, T.A. (2011) "Electrospun nanofibrous materials for neural tissue engineering". *Polymers* **3** (413-426)
- [9] Sinha, V.R. a kol. (2004) "Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview". *International Journal of Pharmaceutics* **278** (1-23)
- [10] Marianne Labet, Wim Thielemans (2009) "Synthesis of polycaprolactone: a review". *Chemical society reviews* **12** (3484-3504)
- [11] Wang, W. a kol. (2008) "Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration". *Journal of Biomedical Materials Research* **84(2)** (557-566)
- [12] Chew, S.Y. a kol. (2008) "The Effect of the Alignment of Electrospun Fibrous Scaffolds on Schwann Cell Maturation". *Biomaterial* **29(6)** (653-661)
- [13] Ramakrishna, S. a kol. *An introduction to Electrospinning and Nanofibers*. Singapore: World Scientific Publishing, 2005. ISBN 981-256-415-2
- [14] Buchko, C.J., a kol. (1999) „Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films". *Polymer* **40(26)** (7397-7407)

- [15] Zhong, X., a kol. (2002) „*Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes*” Polymer **43**(16) (4403-4412)
- [16] Lee, J.S., a kol. (2004) „*Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning*” Journal of Applied Polymer Science **93**(4) (1638-1646)
- [17] Lowery, J.L., a kol. (2010) „*Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibrous mats*” Biomaterials **31**(3) (491-504)
- [18] Hassan, C.M., a kol.(2000) „*Structure and applications of polyvinylalcohol hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods*” Polymer Science and Engineering Laboratories, School of Chemical Engineering
- [19] Hořejší, J. *Lidské tělo*. (2. vydání) Gemini Bratislava 1992. ISBN 80-85264-59-1
- [20] Tucker, N. a kol. (2012) “*The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995*” Journal of Engineered Fibers and Fabrics Special issue - Fibers
- [21] Lanza, Robert, P. a kol. *Principles of Tissue Engineering (Third Edition)*, Academic Press 2000. ISBN 9780124366305.
- [22] Brown, P.J.; Stevens, K. *Nanofibers and nanotechnology in textiles*. Woodhead Publishing Limited, 2007. ISBN 978-1-84569-105-9.
- [23] Ma, P.X.; Elisseeff, J. *Scaffolding in Tissue Engineering*. CRC Press, 2006. ISBN 1-5744-521-9.
- [24] ALBERTS, B., a kol. *Základy buněčné biologie – úvod do makromolekulární biologie*. Espero Publishing (2. vydání) 2005. ISBN 80-902906-2-0.
- [25] Technologie Nanospider, Elmarco <http://www.elmarco.cz/technologie/technologie/>
- [26] Vejražka, M., *Buněčné kultury*. Dostupné na odkazu:
<http://bioprojekty.lfl.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/bunecne-kultury.pdf>
- [27] Vejražka, M., Základní techniky práce s tkáňovými kulturami
<http://chel.lfl.cuni.cz/html/TK.pdf>